

# АНАЛИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

**Введение и способы решения прикладных задач.**

При обсуждении актуальных и важнейших задач анализа пищевых продуктов, приходится сначала обратить внимание на основную цель - защиту потребителя. Для достижения ее необходимы не только профессиональные и исчерпывающие знания таких дисциплин, как технология переработки продовольственного сырья, токсикология, физиология пищеварения, микробиология и *т.д.,*основные знания существующих законодательных требований и стандартов. Приходится принимать квалифицированные решения, касающиеся сложных систем. Сфера решаемых аналитических задач никоим образом не ограничена исследованиями пищевых продуктов. Приходится исследовать табачные изделия, косметику и потребительские товары. Все большую важность (для специалиста, занимающегося анализом пищевых продуктов) приобретают современные подходы к анализу загрязненности окружающей среды. Проблемы сбора образцов, выделения и концентрирования интересующих веществ аналогичны решаемым при исследовании качества пищевых продуктов (за счет чего многие методы легко могут быть заимствованы). Анализ пищевых продуктов сводится к отработке трех основных этапов. Основные задачи могут меняться сообразно конкретной ситуации, но специалист должен быть осведомлен обо всех аспектах. Первым этапом является отбор (исходного) образца, типичного для объекта исследования. Второй этап сводится к подготовке образца к анализу (с минимальными потерями или даже с концентрированием, если интересует содержание микропримесей). Для того чтобы избежать мешающих взаимодействий при обработке сложной матрицы пищевого продукта, специалист должен обладать исчерпывающими знаниями характеристик и свойств всех ее компонентов. Даже на сегодняшний день все еще необходимо знание классических методов. По меньшей мере, необходима хотя бы предварительная информация о предполагаемом количеством содержании интересующих веществ. Инструментальный анализ - важнейшее средство химика, работающего с пищевыми продуктами. Каждая задача должна решаться с помощью наиболее подходящего метода, который должен быть выбран с одной стороны по аналитическим соображениям, а с другой стороны - по соображениям экономичности. На сегодняшний день развитие аналитической химии дает возможность исследовать наличие микропримесей загрязняющих веществ (т.е. решать такие задачи, подход к которым казался невозможным лишь несколько лет назад ). Если учесть необходимость количественного анализа крайне малых содержаний таких веществ, не следует игнорировать тот факт, что концентрации весьма близки к пределам обнаружения. На сегодняшний день во многих случаях совсем не учитывают (статистическую) ошибку анализа.

Разнообразие матриц и ширина спектра исследуемых веществ привели к появлению множества методов. Изучение сильно ядовитых веществ заставило интересоваться способами быстрого обнаружения. Анализ остаточного содержания и примесей загрязняющих веществ ради охраны здоровья населения сводится к определению следовых количеств и микропримесей, из-за чего потребовались многоэтапные физико-химические методы.

Поэтому, аналитику требуется знание всех современных приемов инструментального анализа (таких, как газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, атомно-адсорбционная спектроскопия или электрофорез) с употреблением правильно подобранных детекторов (таких, как масс-спектрометрический, электрохимический или некоторые специализированные спектральные). Каждый специалист, оказывающийся "рабочей лошадкой" в областях исследований, разработок или анализа, должен постоянно совершенствовать свои познания динамически развивающейся инструментальной аналитической химии. Прогресс в применениях капиллярного электрофореза, сверхкритического экстрагирования, лазерной масс-спектрометрии, электронного парамагнитного резонанса, биохимического и иммунохимического анализа (включая, цепную реакцию с полимеразой) заставляет проверять пригодность таких подходов к анализу пищевых продуктов.

Благодаря тому, что обсуждается широкий спектр вариантов анализа, эта книга, написанная Михаэлем Ротауптом, является более чем простым сборником описаний многочисленных решений прикладных задач. Критический подход к обсуждаемым вопросам, показывающий потенциальные или скрытые возможности ошибок, и наличие многих полезных указаний делают эту книгу новым и специальным руководством для любого специалиста, вовлеченного в выполнение анали-

зов. Предоставляемый материал крайне выгоден для любого аналитика, интересующегося решением конкретной прикладной задачи или способом выполнения специфичной работы.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение ....................7
2. Законодательные требования к пищевым продуктам ....................8
2.1 Европейские требования ....................8
2.1.1. Цели и средства их достижения ....................8
2.1.2. Состояние разработки требований в Европе ....................9
2.2. Национальные требования ....................10
3. Общие методы, применимые к анализу пищевых продуктов ....................11
3.1. Пищевые добавки ....................11
3.1.1. Консерванты ....................12
3.1.2. Противоокислители. ....................15
3.1.3. Эмульгаторы ....................18
3.1.4. Красители ....................18
3.1.5. Органические кислоты ....................23
3.1.6. Подслащивающие средства ....................25
3.1.7. Природные полисахариды ....................26
3.2. Загрязнителя окружающей среды ....................27
3.2.1. Тяжелые металлы ....................27
3.2.2. Афлатоксины ....................28
Масс-спектрометрическая идентификация афлатоксинов ....................29
3.2.3. Охратоксин ....................29
3.2.4. Зеараленон ....................30
3.2.5. Патулин ....................31
3.2.6. Пестициды ....................33
3 .2.7. Полиароматические угдеводороды ....................40
3.2.8. Нитрозамины ....................44
3.3. Остатки бактерицидных и лекарственных средств ....................44
3.3.1 Малахитовый зеленый ....................46
3.3.2. Нитрофураны, никарбазнны ....................47
3.3.3. Сульфанидамидные препараты ....................47
3.3.4. Хлорамфеникол ....................49
3.3.5. Препараты пенициллинового ряда ....................49
3.3.6. Тетрациклины, циклоспорины ....................50
4. Специальные методы, применимые к конкретным пищевым продуктам ....................51
4.1. Молоко и молочные продукты ....................51
4.1.1. Афлатоксины ....................51
4.1.2. Консерванты ....................51
4.1.3. Красители ....................52
4.1.4. Противоокислители ....................52
4.1.5 Анионы ....................52
4.1.6. Ферментативная активность ....................52
4.1.7. Органические кислоты ....................52
4.1.8. Сахара ....................52
4.1.9. Углеводы ....................54
4.1.10. Молочный белок ....................54
4.1.11. Триацилглицериды ....................55
4.1.12. Жир, жирные кислоты ....................56
4.1.14. Молочный жир ....................58
4.2. Мясо и мясные продукты ....................59
4.2.1. Соевый белок ....................59
4.2.2. Анионы ....................59
4.2.3. Катионы ....................61
4.2.4. Аминокислоты ....................62
4.2.5. Оксипролин ....................63

4.2.6. Красители .... 63
4.2.7. Определение вида животного .... 63
4.2.8. Жир, жирные кислоты .... 63
4.2.9. Органические кислоты .... 64
4.2.10. Мочевина .... 64
4.2.11. Ботулиновый токсин. .... 65
4.2.12. Бенз(а)пирен (полиоароматическив углеводороды) .... 65
4.2.13. Небелковый азот .... 65
4.2.14. Молочный белок в мясе .... 65
4.3. Рыба и рыбные продукты .... 66
4.3.1. Триметиламин в рыбе .... 66
4.3.2. Гистамин в рыбных продуктах .... 66
4.3.3. Амины .... 66
4.3.4. Сакситоксин в мидиях и морепродуктах .... 68
4.4. Жиры и масла .... 71
4.4.1. Токоферолы (противоокислители) .... 72
4.4.2. Определение степени рафинации жира .... 72
4.4.4. Свободные жирные кислоты .... 74
4.4.5. Спирты алифатического ряда в маслах, подвергшихся переэтерификации .... 74
4.4.6. Летучие галогенсодержащие углеводороды .... 75
4.4.7. Альдегиды .... 75
4.4.8. Фосфолипиды .... 76
4.5. Хлеб и кондитерские изделия .... 77
4 .5.1. Масляная, оротовая, 3-оксимасляная и молочная кислоты .... 77
4.6. Макаронные изделия .... 77
4.6.1. Холестерин .... 77
4.6.2. Красители .... 77
4.6.3. Молочная и 3-оксимасляная кислоты .... 77
4.7. Овощи, фрукты и соки. .... 77
4 .7. 1. Пестициды .... 77
4.7.2. АНИОНЫ ($NO_3$ , Cl, $PO_4$ ) .... 78
4.7.3. Органические кислоты (соотношение лимонной и изолимонной кислот; яблочная кислота) .... 78
4.7.4. Аскорбиновая кислота .... 78
4.7.5. Пролин .... 78
4.7.6. Сахара .... 78
4.7.6. Гесперидин .... 79
4.7.8. Коллоидные частицы в ананасовом соке .... 79
4.8. Вина .... 80
4.8.1. Консерванты .... 80
4.8.2. Сахар .... 80
4.8.3. Подслащивающие вещества .... 81
4.8.4. Красители .... 81
4.8.5. АНИОНЫ (Cl, $NO_3$ , $SO_4$ ) .... 81
4.8.6. Этанол, спирты .... 81
4.8.7. Органические кислоты .... 82
4.8.8. Спирт .... 82
4.8.9. Сульфит .... 82
4.8.10. 2,3-бутандиол .... 83
4.9. Кофе, чай .... 84
4.9.1. Кофеин, теобромин .... 84
4.10. Диетические продукты .... 85
4.10.1Калорийность .... 85
4.10.2. Витамины .... 85

4.10.3. Каротиноиды, хлорофилл ....87
4.11. Ароматические вещества....88
4.11.1. Коньяк, бренди....88
4.11.2. Мед....89
4.11.3. Искусственные ароматизаторы ....89
4 .11.4. Дигидроанетол, дигидросафрол, изосафрол ....89
4.11.5. Ароматические вещества, входящие в состав ванили ....90
4.11.6. Мятное масло ....91
4 .11.7. Ароматизаторы, дающие запах клубивки ....91
4.11.8. Тиолы....91
4.11.9. Горчащие вещества вз хмеля....92
Литература для справок ....94

## 1. Введение

При проверке пищевых продуктов нужны не только знания методов химического анализа, но и осведомленность о том, что нравится потребителю; о требованиях к поставщику (включая и накладываемые запреты). В конечном счете, проверка сводится к оценке и классификации качества. Для правильной расшифровки результатов анализа необходимо владение методами аналитической химии и осведомленность о существующих законодательных требованиях. Данная публикация даст Вам представление о взаимосвязи существующих требований, зависимости от некоторых других положений; о современных методах анализа пищевых продуктов; о новейших возможностях аналитического оборудования. Кроме того. Вы найдете новейшую информацию о требованиях к анализу пищевых продуктов.

В последнее время, весьма усовершенствованы подходы к анализу, аналитические приборы и нормативные требования, предъявляемые в европейских странах и Европейским экономическим обществом. Подобные быстрые изменения ожидаются и в ближайшие годы. Осложненная структура взаимосвязи различных национальных и международных правил иногда препятствует пониманию текущей ситуации. Усиливается влияние Европейского экономического общества на национальные законодательные требования и на решения Европейского суда. Притом, что каждое государство стремится к полному контролю нормативов для пищевой продукции на его собственной территории, в отношениях между странами приходится идти на компромиссы. Европейским экономическим обществом тоже принято такое компромиссное решение: ответственность за соблюдение законодательных требований возложена на исполнительные органы этого общества.

В правилах, разработанных этими органами, следует учитывать общую идею переноса ответственности на каждого члена общего рынка. Каждая из таких стран обязана привести национальные требования в соответствие с разработанными Европейским экономическим обществом. Однако, из-за географических, национальных и культурных особенностей отдельных европейских стран, возникают противоречия принятых нормативов. Главенствующее решение способны принять лишь исполнительные органы Европейского экономического общества.

В тексте подобной публикации никогда не удастся рассмотреть конкретные затруднения и противоречия, связанные с анализом пищевых продуктов. Однако приводимый материал должен помочь найти ответы на многие возникающие вопросы. Например, на такие, как: "какими приборами обычно пользуются для анализа апельсинового сока?", "почему исследуется содержание только специфичных компонентов?", “о чем говорит обнаруженное количество?", "что может дать оценка отношения содержания глюкозы и фруктозы?". В данной публикации приводятся сведения по ныне предъявляемым требованиям к пищевым продуктам. Она дает Вам общее представление о состоянии нормативов, принятых в европейских странах, и, следовательно, поможет подобрать правильный подход к анализу конкретных веществ или метод такого анализа.

Целью настоящего руководства по анализу пищевых продуктов является расширение спектра решаемых задач. Все варианты прикладных применений, обсуждаемые в этой книге, могут быть реализованы с помощью современного аналитического оборудования, предлагаемого фирмой "Хьюлетт-Паккард". Данное руководство будет периодически обновляться (ради освещения все новых достигаемых возможностей).

В книге рассматривается широкий спектр анализов (от основных до более усложненных). Результаты таких анализов оказываются весьма чувствительными к окружающей обстановке. Подобные сложности могут обнаруживаться даже на первом этапе анализа (при отборе исходного образца и при хранении образцов перед фактическим проведением исследований). За счет воздействия ферментов, света или по другим причинам, правильно выполняемый анализ может дать ошибочные результаты (из-за нарушения правил обращения с образцом). Осложнения могут обнаружиться и при подготовке образцов. На этом этапе, для получения наивысшей воспроизводимости требуется пользование протоколируемыми операциями. Поэтому логичным путем преодоления возникающих осложнений оказывается повышение степени автоматизации» При таком подходе обо всех этапах анализа сохраняется информация; сводятся к минимуму ошибки, совершаемые человеком и влияющие на итоги анализа.

Варианты прикладных задач рассматриваются в этой книге с обсуждением всех стадий; от подготовки образца до получения результатов. Приводится описание каждого анализа с дополнительным обсуждением возможных трудностей.

Кроме того, в книге дается информация об альтернативных методах (которые могут быть использованы при работе с другим оборудованием). При обсуждении этих вариантов даются конкретные указания. Кроме того, Вы иногда сможете найти сопоставления различных подходов, соответствующих пользованию различным аналитическим оборудованием (под заголовком "советы и преимущества”). Сопоставление различных приборов и приемов анализа способствует наилучшему принятию решений.

Предоставление лаборатории права экспертизы пищевых продуктов - крайне важный вопрос. Однако в европейских законодательных требованиях к пищевым продуктам решения по нему еще не принято и не совсем ясно, как должна производиться аккредитация лабораторий, контролирующих пищевые продукты.

Целями аккредитации и Требований к организации работ в лабораториях (требований GLP) являются:

- прослеживаемость исследований и полученных данных (результаты анализов должны быть воспроизводимы и хорошо запротоколированы)
- надежность данных
- защита персонала и окружающей среды
- международная сопоставимость данных
- избежание выполнения одних и тех же исследований в разных местах.

Соблюдение этих принципов гарантирует качество, прослеживаемость, целостность и уместность результатов испытаний. Аудитор, проверяющий соответствие требованиям GLP, будет задавать следующие вопросы: Кто проводил анализ? Что он конкретно делал? Где выполнялся анализ? Когда проводился анализ? Какой метод использовался? Какое оборудование использовалось? Что обнаружено? Ответы на все эти вопросы должны иметься в любой момент времени. К анализу содержания пищевых добавок на настоящий момент времени принципы GLP уже применимы.

Для получения более подробной информации о требованиях GLP и об аккредитации лабораторий в пищевой промышленности, изданное фирмой "Хьюлетт-Паккард" справочное руководство.

## 2. Законодательные требования к пищевым продуктам

### 2.1 Европейские требования

Нормативы, установленные Европейским экономическим обществом, могут быть подразделены на три основных уровня: европейские требования, национальные требования и областные требования для каждого государства. Такая строгая иерархия оказывается общей для всех законодательных положений. Порядок подразделения всегда точно соответствует, указанному выше. Европейские требования определяют основу для национальных и областных требований. Если имеются какие-то противоречия по одному и тому же вопросу на национальном и европейском уровнях, арбитражная роль отводится высшему уровню.

#### 2.1.1. Цели и средства их достижения

Общая цель разработки законодательных требований к пищевым продуктам описывается двумя важными формулировками:

1) Охрана здоровья населения (потребителя); каждому хотелось бы потреблять полезные продукты и получать от этого удовольствие.

2) Борьба с жульничеством при продаже пищевых и потребительских продуктов.

Эти формулировки требуют некоторых пояснений из-за различий "культуры питания". Например, на национальном уровне, если продавец пытается продать дешевую рыбу, цвет которой изменен добавкой красного красителя, и утверждает, что это лосось, - это жульничество. Покупатель вправе получить подлинного лосося. Если (он или она) приобрели не то, что намеревались, охране прав способствует национальный уровень и мошенник подлежит наказанию. Этот же случай более сложно отрегулировать с позиций европейского уровня (поскольку существуют положения о свободной торговле). В различных областях встречаются разные продукты со сходным названием. Например, в Италии макароны должны делаться из пшеницы твердой, а изготовленные из какого-то другого сорта зерна считаются некачественной. В других европейских странах бытует иное мнение: макароны изготавливают из любого сорта пшеницы. Можно предположить, что такие макароны импортируют в Италию для продажи в этой стране. Рядовой итальянец стремится купить

продукт из пшеницы твердой и считает обманом попытку продать макароны с плохим качеством. Итальянцы обращаются в Европейский суд и требуют принятия решения об обмане населения своей страны (поскольку такие "плохие товары" называют макаронами). Они добиваются авторитетного запрещения импортировать подобную продукцию в Италию. Они требуют применения статьи 36 договора, заключенного при объединении стран в Европейское экономическое общество. Согласно этой статье, подобная продукция подрывает национальные традиции Италии. Однако, Европейский суд не может согласиться с такой аргументацией и выносит решение о допустимости ввоза макарон в Италию (хотя они и изготовлены не так, как принято в этой стране), но при снабжении достаточно поясняющей этикеткой. Правильное составление этикетки - один из наиболее важных принципов европейских законодательных требований. Подобный вердикт был вынесен касательно так называемой "Дижонской настойки", продающейся во Франции, но не соответствующей требованиям, действующим в Германии. Немцы пытались запретить импорт такой настойки из-за слишком малого содержания спирта. В качестве довода приводилось то, что немцам придется выпивать больше (из-за заниженного содержания спирта), что будет наносить урон здоровью. К какой общей цели (применительно к пищевым продуктам) стремились при подписании договора при объединении стран в Европейское экономическое общество? Как это все согласуется с национальными привычками и традициями населения европейских стран? Европейскому экономическому обществу пришлось приступить к разработке общей законодательной основы, учитывающей все разнящиеся национальные нормативные требования к пищевым продуктам. Это не приведет к устранению всех областных различий, обычных для европейских стран. Никто не задается целью ликвидации национальных особенностей или традиций. Предпринимается попытка разработать единые законодательные положения для всей Европы. Фактически будет создана основа, которую каждая страна, входящая в Европейское экономическое общество, сможет приспособить к собственным национальным требованиям.

Предполагается увязать эти стремления с договором об объединении стран в Европейское экономическое общество (чтобы получить общие критерии качества пищевых продуктов для стран Общего рынка). Реализация этого (одного из самых важных намерений) будет способствовать свободной продаже пищевых продуктов в странах общества.

Свобода продажи ограничивается областными требованиями каждого государства: Вы можете поставлять пищевые продукты в другую страну (входящую в Общий рынок) только в том случае, если соответствуют законодательным нормативам, принятым в этой стране. Эта формулировка требует более подробного пояснения. В договоре об объединении стран в Европейское экономическое общество имеются два пункта, точно регламентирующие описанные выше цели. Согласно пункту 30, ни одной из стран, входящих в Общий рынок, не дозволено отказаться от импорта пищевых продуктов из другой страны (члена Европейского экономического общества), если эти продукты изготовлены в соответствии с европейскими законодательными нормативами. Отказа не допускается, даже несмотря на существование более строгих требований в стране-получателе. Например, в Германии могут действовать положения, ограничивающие ингредиенты пива. Во Франции приняты менее жесткие нормативы, касающиеся употребления добавок в пивоваренной промышленности. В настоящее время, немцы вынуждены согласиться на ввоз пива, не отвечающего требованиям к такой продукции, принятым в Германии (поскольку во Франции пиво выпускается в соответствии с европейскими законодательными требованиями). Единственный аргумент для введения запрета на импорт - доказательство вредного воздействия на здоровье человека. Пункт 36 (договора) точно регламентирует подобные обстоятельства; констатируется, что пункт 30 не применим, если нация способна доказать, что подобные пищевые продукты могут оказать вредное воздействие на здоровье человека, на национальные традиции или культурные предрасположенности.

### 2.1.2. Состояние разработки требований в Европе

Стратегия реализуется с помощью следующих средств: декретов, указаний и рекомендаций. Европейские декреты сразу же вступают в действие в каждой стране (входящей в состав Европейского экономического общества); они не нуждаются ни в какой дополнительной доработке (применительно к особенностям страны). Такие декреты пользуются большим приоритетом, чем

национальные законодательные требования. Поэтому, ни одна страна, входящая в Общий рынок, не может иметь закон, противоречащий европейскому декрету по конкретному вопросу. Указания подвергаются дополнительной доработке с учетом особенностей каждой страны. Текстом указания оговаривается срок, в течение которого каждое государство (член Европейского экономического общества) обязано разработать национальные законодательные требования, согласующиеся с полученным указанием. Если за указанный срок такого приспособления не обеспечено, после истечения этого периода в действие вступает исходная редакция указания. Такая логика обработки была задумана для того, чтобы все нации имели возможность разработки национальных законодательных требований в соответствии с европейскими указаниями. Каждая страна имеет право вводить дополнительные ограничения, но обязана принимать продукты, выпускаемые с соблюдением европейских нормативов. Доработка европейских требований может выполняться по-разному. Давайте рассмотрим пример. Европейскими требованиями устанавливается законодательная основа, например, ограничивается содержание серы в вине. Каждая страна имеет возможность установить более низкие пределы для вина, выпускаемого на своей территории. Однако, ей не дано право запретить импорт вина из другого государства, входящего в Общий рынок, если концентрация серы в этом вине все еще соответствует оговоренной в европейском декрете. Существуют два типа указаний: так называемые горизонтальные и вертикальные указания. Горизонтальное указание имеет отношение ко всем видам пищевой продукции (например, таким указанием регламентируется содержание пищевых добавок). Это значит, что допустимы к использованию только конкретные пищевые добавки. Такие добавки перечислены в одном указании, относящемся ко всем пищевым продуктам. Вертикальное указание касается только одной специфичной группы пищевых продуктов (например, вина или молока).

Рекомендации дают лишь направления для новых разработок. Рекомендация может быть превращена в указание, но не обладает реальной законодательной силой. Иногда такие рекомендации используются для уточнения запросов потребителя. Если применительно к каждому конкретному случаю не сформулированы требования, понадобится оценить то, что могут дать эти виды пищевой продукции потребителю в разных странах. Запросы потребителя считаются одной из наиболее важных причин разработки законодательных нормативов. Совершенствование европейских законодательных требований к пищевым продуктам преследует цель облегчения и упорядочения обмена продукцией (в странах, входящих в Европейское экономическое общество). Для наведения более подробных справок, следует обращаться с национальными законодательными требованиями к "Продовольственному кодексу". Кодекс представляет собой сборник стандартных технологий и условий производства пищевых продуктов. Наибольшее внимание в кодексе уделяется защите здоровья потребителей и предотвращению обмана при составлении этикеток для пищевых продуктов. Комиссия, участвующая в составлении кодекса, создана на международной основе: любая страна, являющаяся членом ООН, может претендовать на привлечение к работе. Комиссия действует в тесном сотрудничестве с Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

## 2.2. Национальные требования

Принятый в Германии закон о пищевых продуктах (в более точной' формулировке: закон о пищевых и потребительских продуктах [обозначается сокращением LMBG]) преследует цели, сформулированные выше для описания состояния разработки европейских требований, а именно: охрану здоровья человека и предотвращение обмана. Употребима та же самая система и с той же самой основой (что и в Европе), но на один уровень (или на один этап) ближе к потребителю. В этом законе о пищевых продуктах сформулированы основополагающие принципы и намерения. Нет ограничений или описаний методов, но предусмотрено предоставление полномочий некоторым министерствам выпускать законы и декреты, накладывающие такие ограничения. Упоминаются сборники методов анализов, одобренных и проверенных специальными учреждениями (т.е. тех методов, которые могут использоваться в качестве арбитражных). Законом о пищевых продуктах и рядом других законов (и декретов) регламентируются состав каждого конкретного вида пищевых продуктов (например, декрет о масле, закон о пиве и т.д.). Такими декретами ограничивается содержание конкретных контролируемых компонентов. Например, имеются горизонтальные требования к содержанию пищевых добавок или пестицидов. В параграфе 35 указывается, что, если

дается ссылка на метод анализа конкретного вещества и Вы хотите соблюсти немецкие законодательные нормативы, Вам необходимо воспользоваться именно этим методом. Подборки методов, описанные в следующих далее разделах этой публикации, описывают новые методы, реализуемые с помощью современных приборов. Большинство из таких методов еще не включено в перечень, предусмотренный законом о пищевых продуктах. Это не значит, что пользуясь такими методами, Вы не соблюдаете принятые в Германии законодательные требования. Однако. Вам придется доказать, что получаемые результаты, по крайней мере, не противоречат ссылкам, приведенным в параграфе 35. Поскольку областные требования характеризуются малыми (очень специфичными) различиями, приходится следить лишь за тем, чтобы не было противоречий таким местным нормативам. Система пользования законодательными требованиями едина для всей Европы. В каждом государстве имеется общий закон о пищевых продуктах, дополняемый прочими законами и декретами, устанавливающими ограничения и условия; требования к пищевым продуктам и используемым этикеткам. Методы оказываются очень схожими, поскольку компоненты пищевых продуктов, способные повлиять на здоровье человека и типичные для конкретного вида продукции, одинаковы во всех европейских странах.

## 3. Общие методы, применимые к анализу пищевых продуктов

Текст данного раздела ссылается на существующие методы, использующие стандартные современные аналитические приемы (такие, как газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия; употребление разнообразных хроматографических детекторов). Прочие варианты анализов, основанные на пользовании узко специализированным оборудованием, здесь не упоминаются. Кратко указываются недостатки конкретных классических методов. Все обсуждаемые методы соответствуют европейским законодательным требованиям. Для ознакомления с их описанием, см. национальные нормативы на пищевые продукты. Общие методы должны удовлетворять горизонтальные требования, обсуждавшиеся ранее (в разделе 2). Такими требованиями устанавливается предельное содержание конкретных веществ во всех пищевых продуктах. Для некоторых видов продуктов, предельные уровни содержания могут оказываться разными (но все они оговариваются одним декретом). Содержание консервантов, противоокислителей и всех прочих пищевых добавок рассматривается в специальном указании, посвященным пищевым добавкам. Это указание вскоре окажется основополагающим для всей Европы.

### 3.1. Пищевые добавки

К традиционным пищевым добавкам относятся: консерванты, противоокислители, эмульгаторы, красители, органические кислоты; вещества, способствующие фильтрации и осветлению; вещества, входящие в состав жвачки и ее оболочки; кислоты, основания, соли, оксиды, неорганические минеральные вещества; подслащивающие средства; среды, способствующие разделению в газовой фазе.

Пищевые добавки - это вещества, вводимые ради улучшения или сохранения качества, или для достижения специальных эффектов. Правила слежения за их содержанием обсуждаются в разделе, посвященном законодательным требованиям. Для анализа используется все виды хроматографии. Современное оборудование дает возможность быстрого количественного определения наличия широкого спектра химических соединений.

Содержание пищевых добавок оговаривается в европейском указании. Законодательные требования, принятые в Европе, соответствуют этому европейскому указанию. В этих требованиях использован так называемый "запрещающий принцип" (т.е. дается разрешение употреблять только дозволенные добавки). Все вещества, не вошедшие в список, запрещены (если не оговорено специальное разрешение использования в конкретных пищевых продуктах). Например, в перечне имеется бензойная кислота, дозволенная к употреблению в нескольких видах пищевых продуктов (таких, как продукты из рыбы и яиц), но этот консервант отсутствует в перечне дозволенных добавок к маргарину. Это значит, что бензойной кислотой нельзя пользоваться при производстве маргарина. Отсутствие запрещенных добавок должно контролироваться в самых разнообразных продуктах. Большое число обследуемых образцов требует высокой пропускной способности (быстроты анализа и высокой степени автоматизации). Современные аналитические приборы дают

возможность пользоваться автоматизированной подготовкой образцов; анализы выполняются в ночное время (без надзора оператора).

### 3.1.1. Консерванты

Консерванты дают возможность хранения пищевых продуктов столь долго, сколь указано на этикетке (до той даты, до которой изготовитель гарантирует пригодность для употребления). Для различных видов продукции устанавливаются различные предельные уровни содержания консервантов. В каждом случае необходимо наводить справки в национальных законодательных требованиях.

Поскольку эти вещества являются пищевыми добавками, запрещающий принцип уместен и для них. Существует лишь одна более важная причина, по которой приходится контролировать содержание консервантов. Причиной является наличие этикеток на пищевых продуктах. В настоящее время все более возрастает желание потребителя пользоваться здоровой пищей. Большинство людей предпочитает приобретать продукты без консервантов (поскольку четко не доказана безвредность всех таких веществ). Покупателю нужно знать, были ли использованы консерванты, перед тем, как он решится на покупку. В данном контексте необходимо отметить, что в качестве консервантов могут использоваться и другие химические соединения, не вошедшие в общий список.

Все вещества, предотвращающие рост микроорганизмов, могут добавляться в пищевые продукты (как консерванты).

Например, в рыбу, рыбные продукты, фрукты и фруктовые соки добавляют муравьиную и пропионовую кислоты.

В мясо, мясные продукты и колбасу могут (в качестве консервантов) добавляться нитриты. Дополнительным эффектом такой добавки в мясо оказывается улучшение цвета этих пищевых продуктов. Нитрит образует комплексы с ниоглобином. Этим комплексам присущ естественный красный цвет, что создает впечатление свежести мяса. Анализ подобных веществ описан в разделе "мясо и мясные продукты".

Существует перечень консервантов (таких, как борная кислота, салициловая кислота, $H_2O_2$, гексаметилентетрамин, однобромистые соединения, уксусная кислота), которые уже запрещено использовать во многих европейских странах. По отношению к этим веществам использован запрещающий принцип европейских указаний.

#### 3.1.1.1. Искусственные консерванты.

Вещества: сорбиновая кислота, бензойная кислота, п-оксибензойная кислота

Подготовка образца; Пищевые продукты с низким содержанием жира обрабатываются следующим образом: раствор ацетата аммония, уксусной кислоты и метанола при pH, который предотвращает диссоциацию слабых кислот (таких, как бензойная), используется для экстрагирования интересующих веществ в ультразвуковой бане. Мутные растворы осветляются и фильтруются с помощью мембранного фильтра. Прозрачные растворы требуют только фильтрации. В случае более сложных матриц, приходится выполнять другие операции по экстрагированию. Могут потребоваться твердофазное экстрагирование, жидко-жидкостное экстрагирование. Наиболее часто, при работе со сложными образцами, применяют перегонку с водяным паром.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, в состав которого входят градиентный насос (позволяющий смешивать 2 компонента подвижной фазы); устройство для введения образца; спектрофотометрический детектор (с возможностью выполнения регистрации на двух длинах волн) или детектор с диодной матрицей.

**Хроматограмма:** см. на стр. 21.

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: с обращенной фазой С-18 (предлагаемая фирмой "Хьюлетт-Паккард" колонка Hypersil ODS (60 x 4,6 мм)  Подвижная фаза: 5мМ раствор ацетата аммония; pH 3,8 (раствор А); ацетонитрил (растворитель В).

Градиентное изменение: О мин - 10%В; 3 мин - 60%В; 5 мин - 90%В

Скорость протока: 4 мл/мин

Температура: комнатная
Вводимый объем: 10 мкл
Длины волн, используемые для обнаружения: сигнал А: 260 нм , сигнал В: 235 нм

**Затрудвения:** Перегонка с водяным паром дает нужный результат лишь тогда, когда кислоты не депротонированы. Только в этом случае они достаточно летучи для перегонки.

Регистрация и количественная оценка с использованием спектрофотометрического детектора, настроенного на длину волны 235 нм, для всех веществ или детектора с диодной матрицей гарантирует возможность обнаружения всех анализируемых веществ, способных к поглощению света в ультрафиолетовой области спектра (бензойная кислота, сорбиновая кислота, эфиры п-оксибензойной кислоты [метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый) и салициловая кислота).

**Советы и преимущества:** Высокоэффективная жидкостная хроматография - наиболее подходящий метод анализа этого класса веществ, поскольку дает возможность обнаруживать широкий спектр веществ. Для подтверждения правильности опознания может использоваться система «газовый хроматограф - масс-спектрометр», но необходимо дополнительное получение производных (чтобы получить вещества, достаточно летучие для анализа методом газовой хроматографии). Повышается опасность разрушения таких веществ, если подобные сложные операции по получению производных не выполняются безукоризненно. Методом жидкостной хроматографии пользоваться гораздо легче. Может применяться обнаружение на индивидуальных длинах волн или селективное обнаружение по способности к флуоресценции (для алкиловых эфиров п-оксибензойкой кислоты). Для регистрации флуориметрическим детектором тоже требуется дополнительное получение производных (бензоилирование). В последнее время пользовались колонкой Hypersil BDS (125 x 4мм), дающей лучшую форму пиков при анализе кислот.

**Литература для справок: 3, 4, 5, 6, 7,97, 98, 99, 100, 101, 102, 103,104**

### 3.1.1.2. Искусственные консерванты

**Вещества**: сорбиновая кислота, бензойная кислота, алкиловые эфиры п-оксибензойной кислоты.

**Подготовка образца:** Экстрагирование из жирных продуктов можно производить после нанесения образца на слой силикагеля в стеклянной колонке. Элюирование производится (после подкисления серной кислотой) смесью гептана, уксусной кислоты, изопропилового эфира.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, в состав которого входят изократический насос, устройство для введения образца, спектрофотометрический детектор (с изменяемой длиной волны ).

**Соответствующие методу параметры:**
Колонка: LiChrosorb Si-60; 150 x 4,6 миу размер частиц 5 микрон
Подвижная фаза: н-гептан/диизопропиловый эфир/уксусная кислота
Скорость- протока: 1,8мл/мйн
Температура: комнатная
Используемая для обнаружения длина волны: 230 нм
Вводимый объем: 10 мкл

**Затруднения:** Состав подвижной фазы приходится приспосабливать соответственно окружающей обстановке и анализируемым веществам. Новые колонки приходится насыщать высоким процентом уксусной кислоты в течение нескольких часов. Рекомендуется пользоваться предварительной колонкой из-за большого пропорционального соотношения этого модификатора в подвижной фазе.

**Советы и преимущества:** Дополнительные преимущества получают за счет автоматизации и подтверждения результатов с помощью снятия спектрограмм детектором с диодной матрицей; автоматического опознания благодаря поиску в спектральных библиотеках.

Может оказаться более целесообразным употребление колонки с обращенной фазой (BDS или ODS, описанной на предыдущей странице).

**Литература для справок: 7, 4, 5.**

### 3.1.1.3. Искусственные консерванты

**Вещества**: сорбиновая кислота, бензойная кислота, эфиры п-оксибензойной кислоты, дегидрацетовая кислота.

**Подготовка образца:** Обработка образцов с низким содержанием жира производится следующим образом: раствор ацетата аммония, уксусной кислоты и метанола при pH, который предотвращает диссоциацию слабых кислот (таких, как бензойная), используется для экстрагирования интересующих веществ в ультразвуковой бане. Мутные растворы осветляются и фильтруются с помощью мембранного фильтра. Прозрачные растворы требуют только фильтрации. В случае более сложных матриц, приходится выполнять другие операции по экстрагированию. Могут потребоваться твердофазное экстрагирование, жидко-жидкостное экстрагирование. Наиболее часто, при работе со сложными образцами, применяют перегонку с водяным паром.

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза.

**Соответствующие методу параметры:** Капилляр: 50 микрон; эффективная длина 56 см; длина 64,5 см

Подвижная фаза: 20 мМ боратный буферный раствор; pH 9,4 -

Напряжение: 465 В/см

Температура: 25°C

Вводимый объем: 50 мбарсек

Используемая для обнаружения длина волны: 192 нм; ширина полосы 2 нм

Контрольная длина волны: 450 нм; ширина полосы 100 нм

**Затруднения:** Регистрация и количественная оценка с использованием спектрофотометрического детектора, настроенного на длину волны 235 нм, для всех веществ или детектора с диодной матрицей гарантирует возможность обнаружения всех анализируемых веществ, способных к поглощению света в ультрафиолетовой области спектра (бензойная кислота, сорбиновая кислота, эфиры п-оксибензойной кислоты [метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый] и салициловая кислота).

**Советы и преимущества**: При пользовании системой для капиллярного электрофореза возможно параллельное обнаружение аспартама, ацесульфама, сахарина и цикламата. Соблюдение требований к подготовке образца не столь существенно (как при работе с высокоэффективным жидкостным хроматографом), поскольку влияние матрицы образца может быть частично устранено регулируемыми режимами введения.

Литература для справок: 163

### 3.1.1.4. Сорбиновая кислота

Сорбиновая кислота может использоваться в качестве пищевой добавки как в жирные продукты, так и в продукты, лишенные жира. Анализ может производиться путем, описанным на стр. 16 (в таком случае употребляются колонки с обращенной фазой).

**Вещество**: сорбиновая кислота

**Подготовка образца**: Подкисленный образец подвергается перегонке с водяным паром. Дистиллят окисляется бихроматом калия, полученный продукт дает окраску при добавлении 2-тиобарбитуровой кислоты (при 95°C). Окрашенное вещество может контролироваться обычным спектрофотометром.

**Прибор:** спектрофотометр

**Соответствувщие методу параметры**:

1) при пользовании получением производного вещества, используемая для обнаружения длина волны: 533 нм

2) без пользования окрашивающей реакцией: Сигнал: 250 нм. Сканирование в диапазоне от 200 до 300 нм

**Затруднения**: Реактив (2-тиобарбитуровая кислота) не хранится более 1 дня. При перегонке с водяным паром должно быть не менее 200 мл в колбе с перегнанной фракцией. Для подкисления образца приходится пользоваться серной кислотой. Потери сорбиновой кислоты при перегонке с водяным паром возможны даже при пользовании более малыми колбами в испарителе. Для подтверждения результатов настоятельно требуется проверять степень извлечения. Для этого может использоваться смесь стандартов или можно воспользоваться методом добавки стандарта в образец.

**Советы и преимущества**: Этот метод рекомендуется для лабораторий, которые уже .пользуются спектрофотометром и нуждаются в способе, не требующем больших затрат (т.е. закупки нового прибора) . .

Такой анализ можно провести и без получения производного вещества. При этом не удастся избежать этапа окисления сорбиновой кислоты бихроматом калия. Затем, производится количественное определение на длине волны 250 нм. Распознание обеспечивается по характеристичной спектрограмме в диапазоне длин волн от 220 до 300 НМ.

**Литература для справок: 7,25.**

### 3.l.l.5. Тиабендазол в цитрусовых и бананах

Тиабендазол представляет собой фунгицид, используемый для обработки уже собранного урожая (наиболее часто употребляется для обработки цитрусовых и бананов, поскольку такие фрукты характеризуются высоким содержанием влаги). Для джемов, приготовленных из загрязненных фруктов, предельно допустимые количества не оговорены.

**Вещество**: тиабендазол.

**Подготовка образца**: Экстрагирование (согласно методу, предложенному Исикки) из гомогенизированных фруктов (из 10 г в течение 3 минут). Добавление 40 мл метанола. Остаток промывают 40 мл метанола. В фильтрат добавляют раствор внутреннего стандарта.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф с изократическим насосом, флуориметрическим детектором, устройством для введения образца, интегратором или системой Chem-Station.

Структура тиабендаэола:

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: Hypersil RP-8 Подвижная фаза: метанол/0,28%раствор $NH_3$ в воде (60:40)

Скорость протока: 0,9мл/нин

Вводимый объем: 50мкл

Условия обнаружения: возбуждающая длина волны 305 нм возбужденная длина волны 350 нм

**Затрудневия**: Приходится следить за правильностью переноса вещества с поверхности фруктов. Потери при касании поверхности могут приводить к потерям и неправильным результатам. Это же является основной причиной, почему приходится следить за содержанием этого вещества. Например, оно находится на поверхности бананов. Если ребенок касается кожуры банана, вещество попадает на его руки. Из-за такой опасности, содержание вещества требуется контролировать. Предельное количество для бананов: 3 мг/кг массы всего фрукта. Для джемов и мармеладов, изготовленных из таких фруктов, предельные количества еще не оговорены. По соображениям безопасности для здоровья, весьма важно следить за содержанием тиабендазола в джемах, мармеладах и, кроме того, в продуктах детского питания.

**Советы и преимущества**: Анализ можно проводить, пользуясь дешевым высокоэффективным жидкостным хроматографом, оснащенным флуориметрическим детектором. Поскольку обычно требуют выполнения двух различных анализов при пользовании разными принципами обнаружения, очень выгодна хроматографическая система, оснащенная и детектором с диодной матрицей (дополнительно к флуориметрическому детектору). Поскольку в кювете детектора не наблюдается разрушения интересующих веществ, количественный анализ и идентификация с помощью второго детектора (флуориметрического) подтверждают результаты, полученные с помощью детектора с диодной матрицей.

**Литература для справок: 98, 106, 107.**

## 3.1.2. Противоокислители.

Противоокислители используются по тем же причинам, что и консерванты, однако действуют они иначе. Консерванты предотвращают рост микроорганизмов. Противоокислители предохранят жир и масла от окисления под действием света и кислорода. При облучении ультрафиолетовым светом, образуются свободные радикалы, что может приводить к разрушению молекул жира. Это

разрушение обуславливает процесс самоокисления. В ходе такого процесса, свободные радикалы способны присоединять молекулы кислорода за счет "реакции с радикалами".

Предельное содержание противоокислителей оговаривается теми же сами указаниями (что и для консервантов) и соответствующим национальным законодательным требованием.

Природные противоокислители (например, токоферолы или аскорбиновая кислота) могут употребляться без строгих ограничений. Однако, к содержанию других противоокислителей (наподобии бутилированного гидрокситолуола [ВНТ], бутилированного гидроксиоксианизола [ВНА] и т.д.) предъявляется жесткие требования. Ни в коем случае оговоренные предельные содержания не могут быть превышены.

### 3.1.2.1. Противоокислители.

**Вещества**: Бутилированный гидрокситолуол (ВНТ); бутилированный гидроксианизол (ВНА); моно-трет-бутилбутирохинон (TBHQ); 2,4,5-тригидроксибутирофенон (THBP); пропилгаллат; октилгаллат; додецилгаллат; Ионокс-100; нордигидрогвайретиновая кислота (NDGA);3,3'-тиодипропионовая кислота (TDPA).

**Подготовка образца**: Анализ жирных пищевых продуктов; масел; картофеля и продуктов из него производится следующим образом: противоокислители экстрагируются смесью растворителей (этанол, ацетонитрил, изопропанол). После отделения отметающих компонентов (жиров), раствор образца может быть проанализирован с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа. Удаление жира может обеспечиваться замораживанием и фильтрацией при -18°С. Часто, анализ производят с помощью тонкослойной хроматографии; при этом употребляют специальные окрашивающие реактивы (такие, как дихлорхинонхлоримид).

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающий смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны) или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hypersil ODS; 60 x 4,6 нн; размер частиц 3 никрона (каталожный номер HP799160D-344)

Подвижная фаза: А = 5 мМ раствор ацетата $NH_4$

В = ацетонитрил

Скорость протока:' 4 мл/мин

Программа градиентного изменения: О мин – 10%В 3 мин – 60%В 4 мин– 80%В 5 мин – 90%В 6 мин - 10%В

Температура: 40 °С

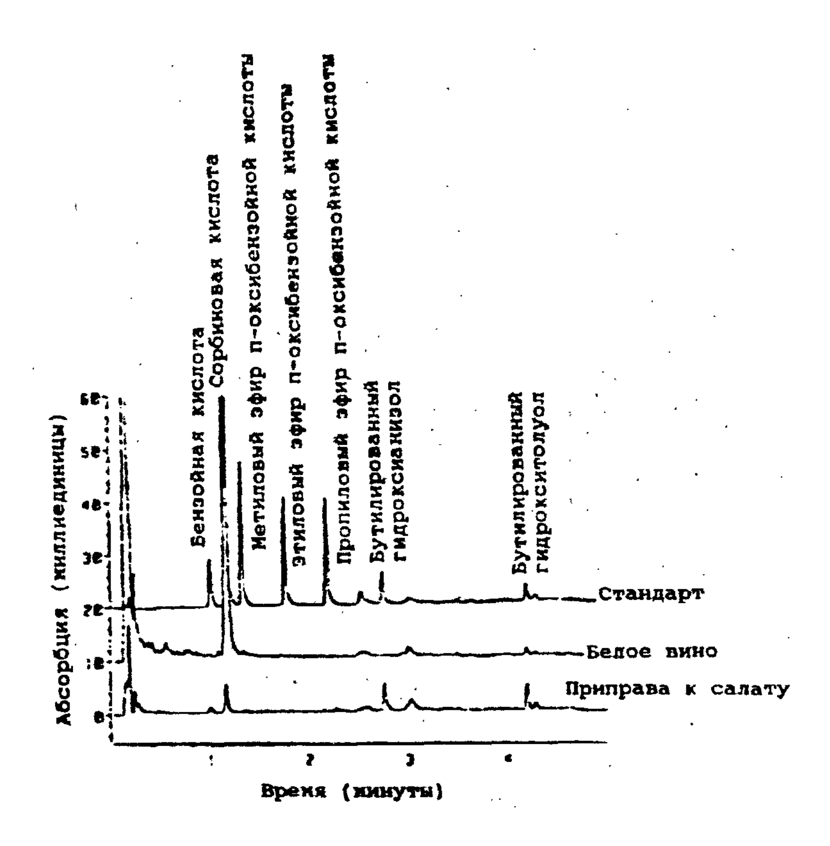
Вводимый объем: 2 мкл

Используемая для обнаружения длина волны: 260 нм

**Затруднения**: Образцы весьма чувствительны к свету (разрушаются под влиянием непосредственно попадающего солнечного света). Рассмотренный здесь быстрый анализ дает надежные результаты даже в том случае, когда выполняется неопытными операторами (поскольку любые потери образца за счет окисления сведены к минимуму). Быстрый анализ с защитой от воздействия дневного света еще более повышает воспроизводимость метода. Кроме того, важно, чтобы образец был избавлен от жира и белков. Белки могут быть осаждены с помощью метода, описанного Carrez[7].

**Советы и преимущества**: Опознание и количественная оценка легко обеспечиваются детектором с диодной матрицей. Для определения содержания этих веществ уходит около 5 минут (при пользовании колонкой с обращенной фазой, нагретой до 40 °С; градиентным элюированием и обнаружением на длине волны 260 ни).

**Литература для справок: 6,7,8,83**.



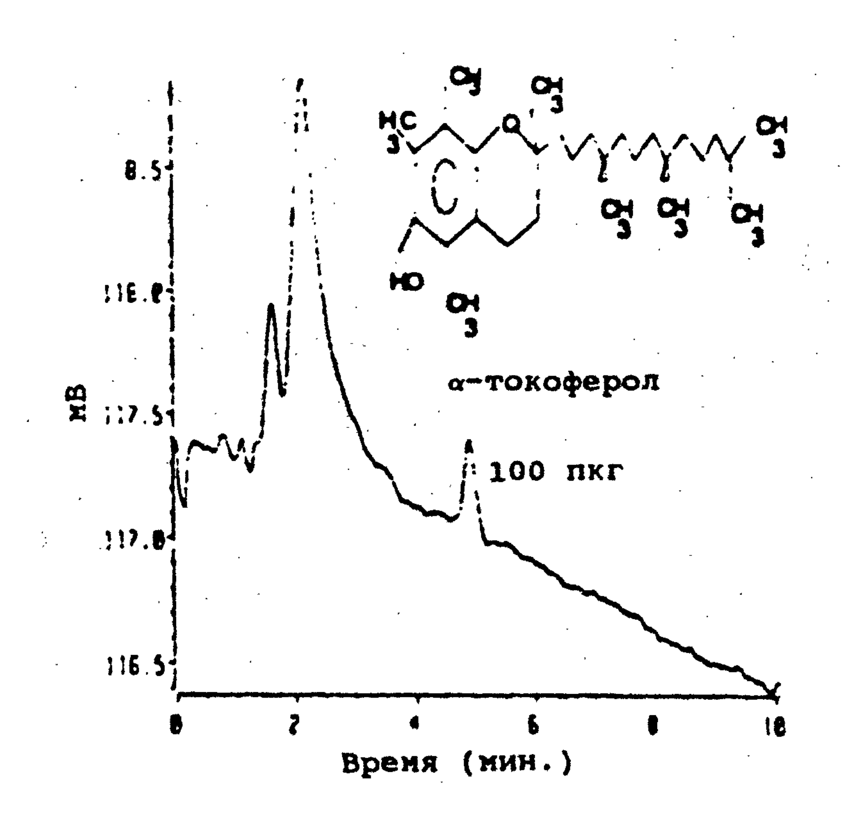

### 3.1.2.2. Токоферол (витамин Е)

Разделение токоферола и триацилглицеридов было в течение многих лет довольно сложной задачей. Иногда добивались более или менее удачного ее решения с помощью газовой хроматографии. Однако, газовая хроматография не дает достаточной информации о полном триацилглицеридном составе. Подобные анализы необходимы при производстве природных масел (в целях контроля качества продуктов, подвергавшихся рафинации).

**Вещества**: токоферол, триацилглицериды, ситостерин, сигмастерин, холестерин, оксиперекиси

**Подготовка образца**: Экстрагирование триацилглицеридов и токоферола из гомогенизированного образца петролейным эфиром

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, электрохимическим детектором




**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: LiChroSpher RP-18; 125 x 4 мм;размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: метанол + перхлорат лития (5 г/л) + уксусная кислота (1 г/л)

Скорость протока: 1 мл/мин Температура: 30 °С

Детектор: электрохимический

Рабочий электрод: стеклоуглеродный

Режим работы: амперметрический

Потенциал 0,9В Диапазон: 0,5 мкА

Электрод сравнения: AgCI/KCI

Постоянная времени: 8 .сек

**Советы и преимущества**: Пользуясь описанным методом, можно

разделять и обнаруживать токоферолы. Кроме того, удается разделять холестерин, сигмастерин и ситостерин.
**Литература для справок: 70,98.**

### 3.1.3. Эмульгаторы

Пищевые продукты, нуждающиеся в стойких эмульсиях (такие, как сыр, маргарин), часто содержат эмульгаторы. В масле таких веществ не должно быть. Обычно, анализ выполняют с помощью тонкослойной хроматографии после довольно сложной подготовки образца.

**Анализ**: вещества экстрагируют из матрицы смесью $CHCl_3$ /MeOH. Экстракт выпаривают досуха. После этого, сухой остаток растворяют горячим метанолом; затем, добавляют раствор гидроксилами-на; выдерживают при нагреве до 150°С (по меньшей мере) в течение 45 минут. Стандарты обрабатывают точно так же. Подкисленный образец анализируют с помощью тонкослойной хроматографии. До сих пор еще нет одобренного метода анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хронатографии. Однако, наиболее целесообразно пользоваться именно таким подходом (при обнаружении веществ, преобразованных в производные перед разделением на колонке, с помощью спектрофотометрического детектора). Температура должна быть достаточно высокой (для обеспечения получения производных). Стандарты нужно обрабатывать точно так же, как исследуемые образцы. Обнаруживаемые вещества: все моно- и ди-глицериновые эфиры лимонной кислоты, эфиры молочной кислоты и других органических кислот. В некоторых пищевых продуктов никаких эмульгаторов может не обнаруживаться. Разрешено использовать лишь ограниченный набор эмульгаторов (в конкретных пищевых продуктах содержание каждого эмульгатора ограничено). Результаты, полученные методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, могут быть подтверждены идентификацией по спектрограммам.

### 3.1.4. Красители

Красители обычно используются для улучшения естественного цвета пищевых продуктов, или для придания им такого цвета, реакция на который "физиологически положительна". Однако, окрашенные пищевые добавки могут употребляться в целях фальсификации (для того, чтобы скрыть порчу, сделать продукты привлекательнее, для маскирования эффектов старения или имитации более высокой биологической ценности). В Европе, пользование красителями ограничивается указаниями по пищевым добавкам соответственно "запрещающему принципу" (этот принцип применительно к пищевым добавкам уже был пояснен в подразделе, касающемся таких добавок). Существуют и другие причины слежения за внесением красителей в пищевые продукты. Главная причина связана с пользованием этикетками. О введении любой пищевой добавки (в данном случае, о красителе) должно быть заявлено на этикетке. Считается обманом, если сообщения о добавке на этикетке нет (поскольку каждый покупатель должен получать полную информацию о том продукте, который хочет купить). На решение о приобретении могут повлиять приводимые на этикетке сведения.

Пищевые красители могут быть подразделены (соответственно источнику их происхождения) на природные и искусственные. Искусственные красители (в свою очередь) подразделяются (по химическому строению) на азиновые, индоловые, трифенилметановые и метиновые. Главным образом, они представляют собой кислотные или анионные красители и содержат кислотные группы (такие, как группы серной кислоты, карбоновой кислоты) или карбоксильные группы, которые дают получение отрицательно заряженного окрашенного иона.

Для определения содержания красителей существует множество классических методов. Первоначальными разработками часто предусматривалось спектрофотометрическое обнаружение. Такой подход до сих пор часто используется (когда требуется обнаружение только одного специфичного вещества). В случае употребления смеси красителей, необходим этап разделения. Очень часто подобные разделения выполняются с помощью тонкослойной хроматографии или бумажной хроматографии. Современное оборудование (такое, как спектрофотометр и высокоэффективные жидкостные хроматографы) дает возможность существенно сократить продолжительность анализа: до нескольких минут вместо нескольких часов. Спектрофотометрическая регистрация обеспечивает

многокомпонентный анализ, благодаря чему повышается интерес к. употреблению такого рода приборов. При пользовании методом тонкослойной хроматографии, количественный анализ и идентификация производятся, главным образом, визуально и благодаря измерению размеров окрашенного пятна. Более объективным средством измерения оказывается сканирующий денситометр, регистрирующий отражение, способный снимать спектрограммы пятен красителей и, кроме того, измерять интенсивность окраски пятна. Этот подход к определению является более точным. Однако, обнаруживаются и затруднения, обуславливаемые недостаточной воспроизводимостью характеристик поверхности тонкослойных пластинок и тем, что различные системы растворителей способны изменять спектрограммы образцов.

Далее рассматривается вариант употребления высокоэффективной жидкостной хроматографии для анализа пищевых красителей. Основной трудностью является необходимость экстрагиронания из очень сложной матрицы (типичной для пищевых продуктов). На этой этапе приходится следить за полнотой извлечения. Кроме того, необходимо экстрагировать все красители в не неизменном виде (т.е. без какого-то изменения структуры, обусловленного воздействием pH или каких-то реактивов). Иногда, может понадобиться этап концентрирования. После такого (предварительного) концентрирования, производятся опознание и количественный анализ.

### 3.1.4.1. Красители.

Красители обычно используются для придания пищевым продуктам более аппетитного вида. Поэтому, для определения качества паевых продуктов приходится распознавать красители и определять их количественное содержание.

**Вещества: Е102, Б104, Е110, Е123, Е124, Е127, Е131, Е132, Е142, Е151.**

**Подготовка образца**: 10 г. образца лицевого продукта гомогенизируют и смешивают с экстрагирующим раствором (0,1% аммиака в 50-процентной смеси этанола с водой). После центрифугирования, раствор переносится в химический стакан на 100 мл. Несколько мл порученного при экстрагировании раствора фильтруют через мембранный фильтр (с размером пор 0,2 микрона).

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, многоволновым спек-трофотометрическим детектором или детектором с диодной матрицей.

**1. Желтый 4 (Е102) 2. Красный 9 (Е123) ' 3. Синий 1 (Е132) 4. Желтый 13 (Е104) 5. Красный 7 (Е124) 6. Красный I (Е151) 7. Желтый 8 (Е110) 9. Зеленый 4 (Е142) 10. Синий 5 (Е131) 11. Красный 14 (Е127)**

**Вреня (минуты)**

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: предлагаемая фирмой «Хьюлетт-Паккард» Hypersil MOS; 100 х 2,1 мм

Подвижная фаза: А -водный раствор 0,01 М $KH_2PO_4$

В- метанол

Градиент: О нин - 10%В

5 мин – 90%В

Скорость протока: 0,6 нл/нин

Температура: комнатная

Вводимый объем: 20 мкл

Используемые для обнаружения длины волн: А - 563 нм В - 520 нм С - 450 нм

Продолжительность разгонки: 6 минут

**Затруднения**: Обнаружение на длине волны В (520 нм) может быть осложнено из-за влияния матрицы образца. Для всех остальных красных пищевых красителей этот метод не применим, поскольку элюирующая способность подвижной фазы слишком высока (все остальные красные красители выходят одним пиком, без удерживания колонкой). При экстрагировании может отмечаться сильное удерживание эритрозина матрицей образца, что приводит к плохой степени извлечения при нейтральных и кислых значениях pH. При пользовании таким методом, настоятельно требуется проверка степени извлечения (благодаря добавкам в образец стандартов красителей). В некоторых случаях, удавалось достигнуть оптимальной степени извлечения (99%).

**Литература для справок: 98, 108, 109.**

### 3.1.4.6. Водорастворимые красителя

**Вещества**: водорастворимые красители

**Подготовка образца**: 10 г. образца пищевого продукта гомогенизируют и смешивают с экстрагирующим раствором (0,1% аммиака в 50-процентной смеси этанола с водой). После центрифугирования, раствор переносится в химический стакан на 100 мл. Несколько мл полученного при экстрагировании раствора фильтруют через мембранный фильтр (с размером пор 0,2 микрона).

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза

**Электрофореграмма**

**Соответствующие методу параметры**: Буферный раствор; 10 мМ фосфатный, 5 мМ $NaHCO_3$ , pH 10,5

Напряжение: 465 В/см

Капилляр: 56/64,5 см; внутренний диаметр 50 микрон

Введение: давлением 100 мбар

Температура: 30 °С

Обнаружение на длинах волн: 215 (ширина полосы 50 нм)

520 (ширина полосы 60 нм) (красный)

410 (ширина полосы 60 нм) (желтый)

598 (ширина полосы 4 нм) (синий)

Контрольная длина волны: не использовалась

**Советы и преимущества:** Спектральная информация, сопоставляемая с хранимой в спектральной библиотеке (в системе обработки данных CheinStation) может подтвердить обнаружение интересующего вещества (а не мешающего химического соединения, имеющегося в матрице образца). Может проводиться анализ чистоты пика (полноты разделения) за счет сопоставления спектрограмм различных частей пика. Вводимые концентрации ведеств попадали в диапазон от 50 до 200 миллионных долей;

Литература для справок: 163

### 3.1.4.1. Крезидин-сульфокислота

**Вещества:** Крезидин-сульфокислота, ( 4,4'-(диазо-амино) бис (5-метокси-2-метилбензолсульфокислота)), соль Шеффера, 6,б'-окси-бис(2-нафталинсульфокислота), красный краситель .номер 40.

**Подготовка образца**: Образец разводится в подкисленной горячей воде и адсорбируется на полиамидном порошке или волокне. Адсорбированные красители смываются нетанольным раствором аммиака.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей ), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с переменной длиной волны) или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: ионообменная, PL 1000 SAX; 50 X 5 мм

Подвижная фаза: А: 0,01 М тетраборат натрия в воде

В: 0,2 мМ $NaClO_4$ в 0,01 $Na_2B_4O_7$

Градиент О- 16 мин О –18%В

16-22 мин 18 - 62%В

'22-40 мин б2%В

Вводимый объем: 20нкл

Используемые для обнаружения длины волн: А: 254 нм В; 355 нн (ширина полосы 30 нн)

**Затруднения:** Если степень разделения оказывается недостаточной, отрегулируйте систему для обеспечения более качественного разделения этих веществ. Предварительная очистка образца снизит помехи со стороны мешающих веществ, присутствующих в матрице образца.

**Советы и преимущества**: Пользование детектором с диодной матрицей позволяет идентифицировать пики по временам удерживания и спектрограммам. Проверка чистоты пиков может выявить совместно элюируемые вещества. Высокоэффективная жидкостная хроматография - самый подходящий метод для такого анализа, поскольку удается за одну разгонку обнаружить, опознать и количественно . оценить содержание целого ряда веществ.

**Литература для справок**: 7,9, 10, II, 12, **96.**

### 3.1.4.2. Желтый краситель номер 5

Водный раствор анализируется методом ионообменной жидкостной хроматографии (при пользовании градиентным элюированием).

**Вещества**: Тартразин (желтый краситель номер 5, Е102)

**Подготовка образца:** Образец разводится в подкисленной горячей воде и адсорбируется на полиамидном порошке или волокне. Адсорбированные красители смываются метанольным раствором аммиака.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с переменной длиной волны) или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: ионообменная колонка PL 1000 SAX; 50 х 2,1 мм

Подвижная фаза: А: 0,01 М тетраборат натрия вводе

B:0,1мМ $NaClO_4$ в 0,01 $Na_2B_4O_7$

Градиент: 0 - б мин 0- 7%В

6 - 18 мин . 7- 26%В

18 - 22 мин 26 - 35%В

22 -30 мин 35-951В

30 -35 мин 95%В .:

Скорость протока: 1,0 мл/мин.

Вводимый объем: 50мкл

Используемая для обнаружения длина волны; 358 нм (ширина полосы 20 нм)

**Затруднения:** От периода уравновешивания между градиентными разгонками (промывка только растворителем А) зависит способность колонки разделять первую пару выходящих пиков (фенилгидразин-п-сульфокислоту (PHSA)) и сульфаниловую кислоту [SA]. Если разрешающей способности не достаточно, повысьте продолжительность периода уравновешивания.

**Советы и преимущества:** Крайне необходима фильтрация того и другого компонентов подвижной фазы. Разделение всех стандартов и образцов должно производиться сразу же после их подготовки, поскольку возможно разрушение под действием ультрафиолетового света.

**Литература для справок:** 7,9,10,11,12,96,97.

### 3.1.4.3. Красный краситель номер 3

Эритрозин используется в целях надежного окрашивания пищевых продуктов. В некоторых европейских странах, входящих в общий рынок, требования к содержанию этого красителя изменились и эритрозин оказался разрешенным только в нескольких продуктах из вишни (при этом, его допустимое предельное содержание составляет 150 мг/кг). Поэтому, понадобился метод опознания и количественного определения содержания этого красителя.

**Вещество**: Эритрозин.

**Подготовка образца:** 10 г. образца пищевого продукта гомогенизируют и смешивают с экстрагирующим раствором (0,1% аммиака в 50-процентной смеси этанола с водой). После центрифугирования, раствор переносится в химический стакан на 100 мл. Несколько мл полученного при экстрагировании раствора фильтруют через мембранный .фильтр (с размером пор 0,2 микрона).

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с переменной длиной волны) или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: с обращенной фазой С-18 (предлагаемая фирмой "Хьюлетт-Паккард" колонка Hypersi-lODS)

Подвижная фаза: А: Раствор сульфата натрия вводе (6,44 г/л), рН 2,5 (доводка с помощью $H_2PO_4$ )

В: метанол Смесь А:В = 10:29 (соотношение объемов) Изократическое разделение

Скорость протока: 1,0 мл/мин
Температура: комнатная
Вводимый объем: 20 мкл
Используемая для обнаружения длина волны: А: 536 НМ . В: 254 нм
Продолжительность разгонки: 10 минут

**Затруднения:** Обнаружение на длине волны В может быть осложнено из-за влияния матрицы образца. Для всех остальных красных пищевых красителей этот метод неприменим, поскольку элюирующая способность подвижной фазы слишком высока (все остальные красные красители выходят одним пиком, без удерживания колонкой). При экстрагировании может отмечаться сильное удерживание эритрозина матрицей образца, что приводит к плохой степени извлечения при нейтральных и кислых значениях pH. При пользовании таким методом, настоятельно требуется проверка степени извлечения (благодаря добавкам в образец стандартов красителей). В некоторых случаях, удавалось достигнуть оптимальной степени извлечения (99%).

**Литература для справок: 108, 109.**

### 3.1.4.5. Каротиноиды и хлорофилл, содержащие пигменты.

**Вещества**: каротин, хлорофилл, ксантофилл, лутеин, виолаксантин, неоксантин, неохром, ауроксантин, эпоксид лутеина

**Подготовка образца**: Фрукты подготавливаются для анализа точно так же, как они подготавливаются для приема в пищу (т.е. несъедобные части удаляются). Экстрагирование производится после смешивания 50 г фруктовой пасты с 1-2 г карбоната натрия. Затем, добавляют ацетон для получения (примерно) 80% раствора при pH 8-9. Для отделения раствора от осадка необходимо центрифугирование. Эта операция повторяется до тех пор, пока остаток не остается обесцвеченным. Супернатанты собираются и подвергаются жидко-жидкостному экстрагированию в делительной воронке с диэтиловым эфиром. Органическая фаза испаряется, и состав ее остатка анализируется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Кроме того, возможно и извлечение каротиноидов методом сверхкритического экстрагирования. При таком подходе, не требуется органических растворителей. Процесс сверхкритического экстрагирования быстр и полностью автоматизирован.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим, устройством для введения образца, многоволновым спектрофотометрическим детектором или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: с обращенной фазой С-18 (предлагаемая фирмой "Хьюлетт-Паккард" колонка Hypersil ODS)
Подвижная фаза: метанол/ацетонитрил/тетрагидрофуран (35:58:7) Изократическое разделение
Скорость протока: 1,0 мл/нин
Температура: 30°С'
Вводимый объем: 2 мкл
Используемые для обнаружения длины волн: А: 425 нм В: 400 НМ . С: 504 НМ
Продолжительность разгонки: 45 минут

**Затруднения:** При работе с образцами на свету, следует учитывать чувствительность веществ к свету. Существует и другой подход, описанный в публикации 110 (основанный на пользовании тонкослойной хроиатографией). Такой анализ должен проводиться в полной темноте (из-за возможности разрушения интересующих веществ).

**Советы и преимущества**; Можно пользоваться 1-волновым спектрофотометрическим детектором (при установке высокой чувствительности). Однако в этом случае, для подтверждения результатов придется ввести дополнительный этап химической идентификации. При работе с детектором с диодной матрицей, за одну разгонку возможны опознание и количественный анализ различных молекул с очень схожей структурой. Оптимальная длина волны (дающая наивысшую чувствительность) попадает в диапазон от 400 до 500 нм. При пользовании детектором с диодной матрицей, можно настраивать прибор на оптимальные длины волн для всех веществ.

**Литература** для **справок:** II, 12, **19**, 20, 21, 22, **110**, III.

### 3.1.5. Органические кислоты

Некоторые вещества, имеющиеся в пищевых продуктах, тоже попадают под классификацию добавок (хотя они и представляют собой природные химические соединения). Возьмите, например, органические кислоты. Они могут входить в состав пищевых продуктов, но, кроме того, могут и добавляться к другим пищевым продуктам. Когда они добавляются как соли органических кислот, их правомерно считают добавками. Органические кислоты могут вноситься для подкисления пищевых продуктов, для улучшения вкуса (например, колбас). Никогда не удастся определить, была ли добавлена органическая кислота в виде кислоты или соли, но обеспечиваются некоторые возможности получить информацию об искусственных добавках за счет определения количественного содержания и подсчета соотношения различных кислот. Анализ таких веществ может выполняться с помощью разного оборудования, при малых затратах времени и с высокой воспроизводимостью. Далее рассматриваются два подхода к анализу: с помощью капиллярного электрофореза и с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для определения этого класса веществ предлагаются проверочные наборы специфичных ферментов. Количественный анализ обеспечивается спектрофотометрически. Все эти зависимые от времени реакции могут контролироваться системой ChemStation, обслуживающей спектрофотометр (используется специальный вариант программного обеспечения, обслуживающий кинетический анализ и имеющий название "Boehringer Test"). Пользование такими наборами дает возможность анализа перечисленных ниже кислот. Для каждой кислоты требуется собственный специфичный фермент, который должен индивидуально проверяться перед анализом на степень извлечения. Порча веществ и плохие условия хранения могут привести к следующим затруднениям при пользовании таким подходом к анализу.

Наборы специфичных ферментов, используемых при анализе органических кислот, предлагаются для: уксусной, муравьиной, аскорбиновой, янтарной, пировиноградной, лимонной, глюконовой, глутаминовой, изолимонной, молочной и щавелевой кислот. Все эти вещества могут быть проанализированы за одну разгонку с помощью описанного дальше метода.

#### 3.1.5.1. Анализ органических кислот с помощью капиллярного электрофореза

**Вещества**: Лимонная кислота, щавелевая кислота, муравьиная кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, пировиноградная кислота, уксусная кислота, молочная кислота, фенилуксусная кислота

**Подготовка образца:** Возможно непосредственное введение прозрачных растворов. Необходима фильтрация мутных растворов. В случае сложных матриц образца (таких, как мясо и колбасы), рекомендуется очистка образца на ионообменной колонке с использованием элюента, имеющего pH 2-3. После этого, элюирование производят элюснтов с высоким pH (8 - 9). Выбор pK зависит от стабильности веществ и от характерных для них значений pK*

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза.

Электрофореграмма: Органические кислоты в пиве

**Соответствующие методу параметры**: Буферный раствор: 5нМ раствор фталата (pH *7,0) 0,25* мМ раствор хлорида цетилтриметиламмония

Капилляр: эффективная длина 72 сн; внутренний диаметр 75 микрон; длина 80,5 см

Введение: 200 мбарсек

Температура: 15°C

Напряженность поля: -310 В/см

Обнаружение: косвенное, по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра (детектором с диодной матрицей) Используемая для обнаружения длина волны: 300 '(ширина полосы 16 нм); контрольная длина "волны 210 нм (ширина полосы 20 нм)

**Затруднения:** Идентификация в режиме косвенного обнаружения основана только на информации о временах миграции. В лабораториях, занимающихся контролем качества продукции, может потребоваться дополнительная очистка образца на ионообменных колонках, чтобы снизить к минимуму риск ошибочности результатов (за счет наличия мешающих веществ, выходящих из капилляра в то же самое время).

**Советы и преимущества**: Для косвенного обнаружения (по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра) использовался фталатный буфер. Поменяли местами длину волны, исполь-

зуемую для регистрации, и контрольную длину волны (чтобы получить положительные пики). Для изменения направления электроосмотического потока и снижения продолжительности анализа, использовали СТАС. В целях подбора оптимальных параметров для такого обнаружения, крайне полезно пользоваться детектором с диодной матрицей и иметь всю необходимую информацию для оценки данных (такую, как спектрограммы анализируемых веществ). Пузырьковая кювета характеризуется в три раза увеличенным внутренним диаметром в зоне пропускания света. За счет этого длина оптического пути в 3 раза больше (что фактически не оказывает влияния на разрешающую способность). Для получения хорошей воспроизводимости многократных анализов (особенно, при косвенном обнаружении по поглощению света), необходимо программируемое автоматическое пополнение буфера.
**Литература для справок:** 4, 7, 13, 14, 15, 16, 17, 95

### 3.1.5.2. Анализ органических кислот с помощью капиллярного электрофореза

Итаконовая, цитраконовая, мезаконовая кислоты являются метаболитами лимонной кислоты и (поэтому) тоже присутствуют в сырых зернах кофе.

**Вещества:** Лимонная кислота, цитраконовая кислота, трансако-новая кислота, мезаконовая кислота, итаконовая кислота

**Подготовка образца**: Фильтрация и (или) разбавление жидких образцов. Экстрагирование из твердых или полутвердых образцов обеспечивается рабочим буферным раствором (тем, который используется для анализа). После экстрагирования приходится выполнять фильтрацию. При экстрагировании (для получения количественно точного растворения) рекомендуется пользоваться ультразвуковой баней.

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза.

**Соответствующие методу параметры**:

Буфер: 10 мМ раствор тетрабората натрия (pH 9,2)
Капилляр: длина 64 сн; внутренний диаметр 75 микрон Введение: 18,9 нм
Температура: 35°С
Напряжение: 20 кВ
Программируемый по времени параметр: давление (10 мбар)
Обнаружение: с помощью детектора с диодной матрицей
Длина волны: 254 нм

**Затруднения:** Погрешность воспроизводимости площадей пиков при пользовании капиллярным электрофорезом во многих случаях не менее 2%. При пользовании этим методом, среднеквадратичное стандартное отклонение может быть снижено до 0,5%. При экстрагировании из твердых образцов необходимо пользоваться ультразвуковой баней.

**Советы и преимущества**: Указанные выше кислоты характеризуются очень схожей молекулярной структурой. Для получения малой продолжительности анализа необходимо приложение к капилляру давления. Момент создания такого давления может выбран соответствующим 7-ой минуте (при пользовании моделью HP3DCE системы для капиллярного электрофореза). Кроме того, удается повысить воспроизводимость (погрешность, определяемая по площади пика, становится равной 0,5% (по среднеквадратичному отклонению) вместо 2%; погрешность, определяемая по времени миграции - до 0,33% (по среднеквадратичному отклонению)).

**Литература для справок: 94,** 7, 13, 14, 15, 16, 17

### 3.1.5.3. Анализ органических кислот с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

**Вещества**: Щавелевая кислота, лимонная кислота, винная кислота, янтарная кислота, муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота

**Подготовка образца:** Экстрагирование из твердых матриц обеспечивается подкисленной водой. Мутные экстракты требуют осветления, по методу, предложенному Carrez; после чего производится фильтрация.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим устройством для введения образца, многоволновым спектрофотометрическим детектором или рефрактометрическим детектором

**Соответствующие методу параметры**:

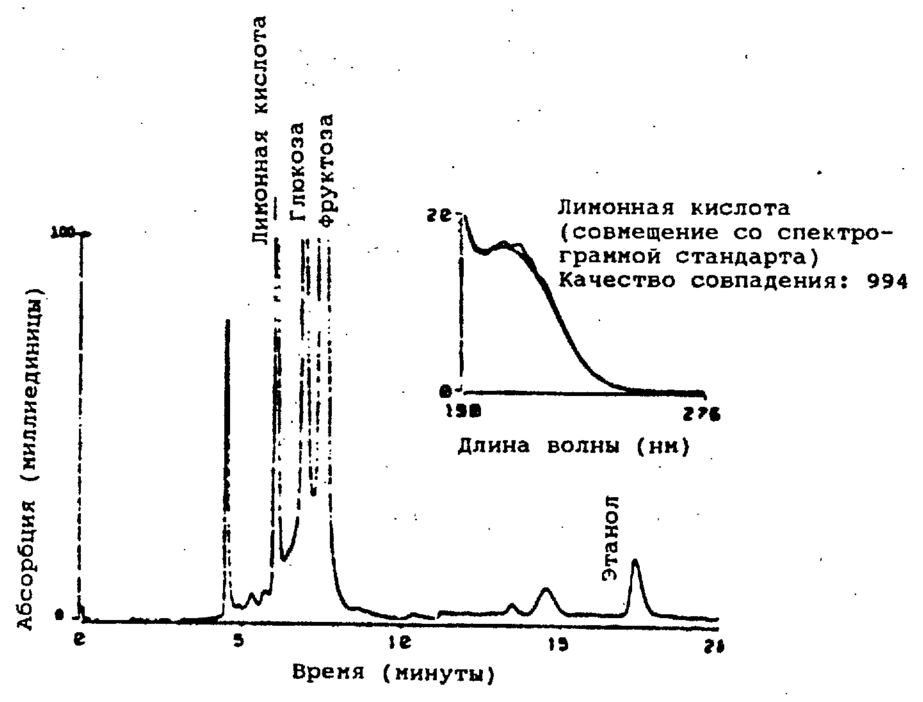
Колонка: ионообменная Bio-RAD ИРХ 87Н; длина 300 мм; внутренний диамотр 7,8 мм

Подвижная фаза; вода (0,008 н. раствор серной кислоты)

Скорость протока: 0,8 мл/мин

Температура: 65°С

Используемые для обнаружения длины волн: А: 190 нм (ширина полосы 4 ни) В: 200 нм (ширина полосы 4 нм) **Советы и преимущества:** Количественный анализ целого ряда органических кислот может обеспечиваться за одну разгонку. Возможно параллельное обнаружение и других веществ (например, некоторых спиртов алифатического ряда). На этапы подготовки образца затрачивается гораздо меньшее время, чем при подготовке к индивидуальному анализу каждого вещества. Если пользоваться ферментным анализом, следует учитывать высокую стоимость таких (ферментных) реактивов и то, что они чувствительны к температуре и свету.




**Литература для справок**: 89,7,13,14,15,16,17

## 3.1.6. Подслащивающие средства

Искусственные подслащивающие средства дают больший эффект (при добавлении в пищевые продукты), чем сахароза (при этом обеспечивается более низкая калорийность). Они используются в диетических продуктах, газированных напитках и в прочих случаях. Содержание таких средств ограничивается национальными законодательными требованиями и, кроме того, указанием для диетических продуктов[17] (это указание считается более приоритетным и устанавливает более строгие требования к продуктам для диетического питания). Во всех этих документах приводится список разрешенных подслащивающих средств; использован запретительный принцип (могут использоваться только вещества, упомянутые в списке; остальные запрещены).

Анализ: экстракция из образца обеспечивается смесью метанола с водой; экстракт фильтруют и очищают с помощью патрона SEP-Pak С-18 для твердофазного экстрагирования. Для идентификации и количественного определения сахарина пользуются высокоэффективным жидкостным хроматографом (спектрофотометрический детектор или детектор диодной матрицей); колонкой RP18; подвижной фазой, представляющей собой специальную смесь метанола с фосфатным буфером. Изократическое разделение производится при скорости протока .1,2 мл/мин; при температуре 35°С для обнаружения используется длина волны 235 нн, ацесульфам-К обнаруживают при следующих условиях: изократическое разделение; смесь воды, метанола и буферного раствора в качестве подвижной фазы; скорость протока 0,7 мл/мин; комнатная температура; длина волны 227 нм. Для обнаружения аспартама пользуются колонкой Hypersil ODS; градиентным элюированием при употреблении смеси метанола с буферным раствором; температура 40°С; после получения

производных с помощью ортофталевого альдегида (OPA), регистрацию производят на длине волны 338 нм.

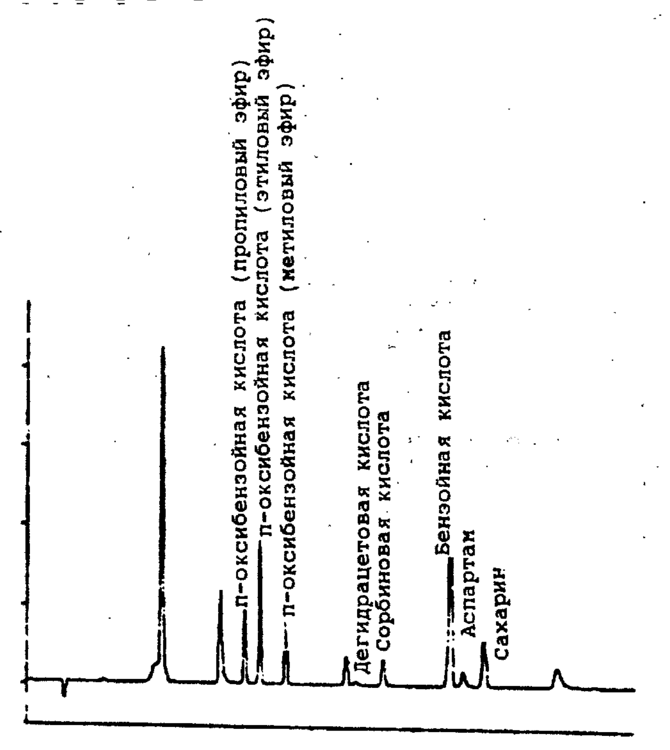
### 3.1.6.2. Искусственные подслащивающие средства

**Вещества:** Сахарин, цикламат, аспартан, асцсульфам

**Подготовка образца**: Обработка образцов с низким содержанием жира производится следующим образом: раствор ацетата аммония, уксусной кислоты и метанола при pH, который предотвращает диссоциацию слабых кислот (таких, как бензойная), используется для экстрагирования интересующих веществ в ультразвуковой бане. Мутные растворы осветляются и фильтруются с помощью мембранного фильтра. Прозрачные растворы требуют только фильтрации. В случае более сложных матриц, приходится выполнять другие операции по экстрагированию. Могут потребоваться твердофазное экстрагирование, жидко-жидкостное экстрагирование. Наиболее часто, при работе со сложными образцами, применяют перегонку с водяным паром.

**Прибор;** Система для капиллярного электрофореза

**Электрофореграмма:**




**Соответствующие методу параметры:**
Капилляр; 50 микрон: 56/64,5 см
Подвижная фаза: 20 мМ боратный буфер, pH 9,4
Напряжение: 465 В/см
Температура; 25°С
Вводимый объем: 50 мбарсек
Используемая для обнаружения длина волны; 192 нм (ширина полосы 2 нм )
Контрольная длина волны; 450 ни (ширина полосы 100 нм)

**Затруднения:** Регистрация и количественная оценка с использованием спектрофотометрического детектора, настроенного на длину волны 235 нм, для всех веществ или детектора с диодной матрицей гарантирует возможность обнаружения всех анализируемых веществ, способных к поглощению света в ультрафиолетовой области спектра (бензойная кислота, сорбиновая кислота, эфиры п-ок-сибензойной кислоты [метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый] и салициловая кислота).

**Советы и преимущества**: При пользовании системой для капиллярного электрофореза возможно параллельное обнаружение аспартама, ацесульфама, сахарина и цикламата. Соблюдение требований к подготовке образца не столь, как при работе с высокоэффективным жидкостным хроматографом, поскольку влияние матрицы образца может быть частично устранено регулируемыми режимами введения.

Подход, описанный на стр. 17, дает возможность определять содержание искусственных подслащивающих средств и консервантов за одну разгонку.

**Литература для справок: 95, 7, 17, 18, 163**

## 3.1.7. Природные полисахариды

Природные полисахариды используются для улучшения структуры и консистенции пищевых продуктов (таких, как кремы, йогурт, десерты и соусы); продуктов диетического питания (например, детского). О качестве таких продуктов часто судят по их консистенции. Плохое качество может быть замаскировано добавлением крахмала. Из-за возможности подделок, возникает необходимость опознания и количественной оценки содержания каждого индивидуального полисахарида

(согласно требованиям, предусмотренным национальными стандартами). Неперевариваемые полисахариды (кормовой балласт) тоже калорийны и приходится следить за их содержанием в продукции из непросеянной муки (которая относится к лечебным продуктам питания, способствующим улучшению пищеварения ). Покупатели могут оказаться обманутыми, когда содержание природных полисахаридов не так высоко, как заявлено имеющимися на упаковке рекламными надписями.

### 3.1.7.1. Природные полисахариды

**Вещества**: Альгиновая кислота, карбоксиметилцеллюлоза, харрагинин, камедь рожкового дерева, пектин, аминированный пектин; трагакантановая камедь, ксантановая камедь

**Подготовка образца**: После очистки образца, полисахариды гидролизуются до моносахаридов и могут анализироваться с помощью газовой хроматографии (при обнаружении пламенно-ионизационным детектором) или высокоэффективной жидкостной хроматографии в Германии, метод газовой хроматографии считается стандартным для таких веществ. Все смеси стандартов должны обрабатываться точно так же, как образцы. Если в образце имеется жир (свыше 2%), от него необходимо избавиться перед анализом. Обычно, это обеспечивается центрифугированием 25 г образца (или 5 г сухого образца, разбавленного водой) после добавления 40 мл смеси ацетонитрила с дихлорметанон. В случае образцов, в которых количество крахмала превышает 0,5% (о чем судят рефрактометрическим способом), необходимо ферментативное уничтожение крахмала. Заключительный этап обработки сводится к растворению сульфасалициловой кислотой, очистке фильтрацией, осаждению за счет добавления этанола (после чего дают выставиться в течение 2 часов). Осадок, после этого гидролизуют соляной кислотой в метаноле (в котором нет воды) в течение 4 часов при IGO^C. После добавления 0,05 мл пиридина (и какого-то внутреннего стандарта), раствор выпаривают досуха. После силилирования в пиридине, производят анализ методом газовой хроматографии.

Прибор: газовый хроматограф (с пламенно-ионизационным детектором)

Соответствующие методу параметры:

Температура термостата: от 120 до 220°С со скоростью 4°С/мин
Колонка: Durabond DB-5; длина 30 н; внутренний дианетр 0,32 мм
Температура устройства для введения образца: 250°С
Температура головки детектора: 290°С
Газ-носитель: азот: 1,5 мл/мин
Деление потока: 1/150 - 1/100
Вводимый объем: 1-2 мкл
Внутренний стандарт: пиридин

**Затруднения:** Вся подготовка образца должна выполняться при слежении за полным отсутствием воды. Каждый индивидуальный раствор (растворитель) должен быть обезвожен. Продолжительность процессов ферментативного уничтожения и гидролиза (при подготовке образцов) нельзя сокращать, иначе может наблюдаться превышение оговоренных предельных количеств вдвое.

**Советы и преимущества**: Все смеси стандартов должны обрабатываться точно так же, как образцы. Если в образце имеется жир (свыше 2%), от него необходимо избавиться перед анализом. Обычно, это обеспечивается центрифугированием 25 г образца (или 5 *г* сухого образца, разбавленного водой) после добавления 40 мл смеси ацетонитрила с дихлорметаном. Рассмотренный способ подготовки образца может быть подменен восстановительным гидролизом кислотами Льюиса. Преимуществом такого гидролиза является получение исходных моносахаридов, которые обычно разрушаются при той подготовке образцов, которая описана выше.

**Литература для справок**: 37, 38,39,40

## 3.2. Загрязнителя окружающей среды

### 3.2.1. Тяжелые металлы

Содержание тяжелых металлов (таких, как свинец, медь, кадмий) исследуется с помощью атомно-адсорбционной спектроскопии. Металл должен быть растворен количественно (обычно, в «царской водке» иногда используются модификаторы). Некоторые металлы требуют

специальной обработки (для обеспечения растворения). Кроме того, пользуются и плазменно-эмиссионными спектрометрами.

### 3.2.2. Афлатоксины

В Европе ограничено содержание афлатоксинов во всех пищевых продуктах (поскольку эти вещества очень токсичны и наносят урон здоровью), хотя афлатоксины могут обнаруживаться в масличных фруктах, в семенах, в орехах (арахис, бразильский орех, фисташки), в специях (в зернах перца).

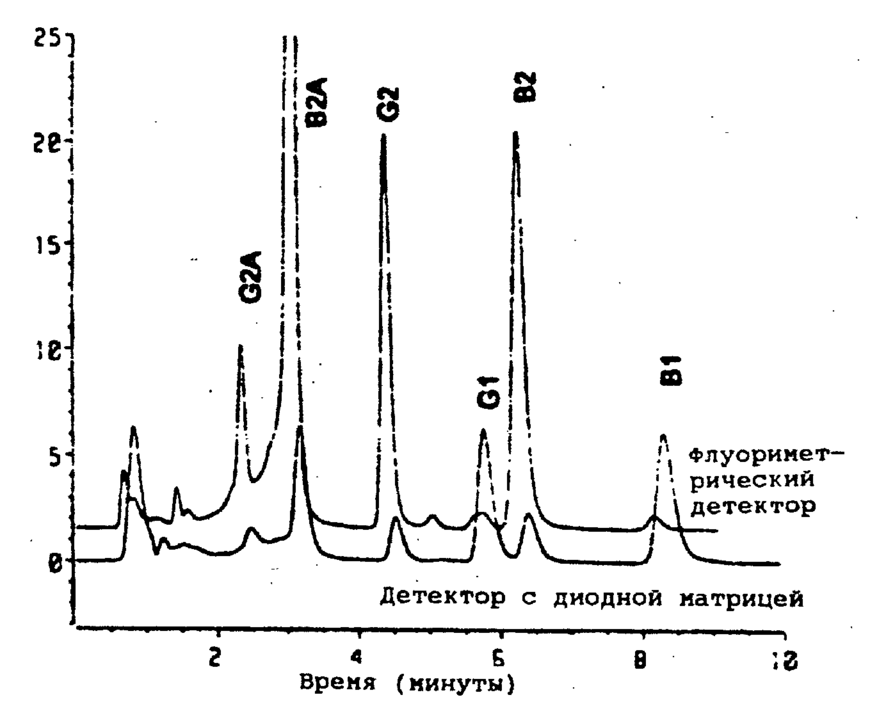
Общее содержание не должно превышать 4 мкг/кг, а содержание афлатоксина B1 должно быть менее 2 мкг/кг.

**Анализ:** после экстрагирования хлороформом, образец очищают на колонке, заполненной силикагелем, с использованием сульфата натрия. Обнаружение и количественная оценка обеспечиваются методом 2-мерной тонкослойной хроматографии и косвенной денситометрической регистрацией по флуоресценции. Способность афлатоксинов в растворе разрушаться под воздействием дневного света заставляет производить весь анализ в темной комнате. При большой продолжительности анализа могут отмечаться дополнительные потери. Относительно высок риск воздействия этих опасных веществ на операторов. Надежные результаты могут быть получены только очень опытными специалистами.

Возможны и другие инструментальные подходы, включая экстрагирование жидкой средой при сверхкритических условиях (хотя нет еще полностью разработанного метода). Возможны идентификация и количественная оценка с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (при обнаружении флуориметрическим детектором). Высокой чувствительности (при обнаружении по способности к флуоресценции) можно добиться благодаря получению производных до разделения на колонке (за счет реакции с трифторуксусной кислотой) или после разделения на колонке (за счет реакции с йодом; в этом случае, требуется оснащение хроматографа дополнительным насосом). Употребление метода высокоэффективной жидкостной хроматографии дает следующие преимущества: сокращение продолжительности анализа; защита анализируемых веществ от воздействия дневного света; сниженный риск подверженности оператора воздействию афлатоксинов.

#### 3.2.2.1. Афдатоксины

**Вещества**: Афлатоксины B1, B2, M1, M2, Gl, G2




Подвижная фаза: вода/метанол/ацетонитрил (63/26/11) .

**Подготовка образца**: После экстрагирования хлороформом, образец очищается на стеклянной колонке, заполненной силикагелем с дополнительным слоем сульфата натрия. Афлатоксины элюируются хлороформом.

**Прибор;** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей, флуориметрическим детектором

Хроматограмма:

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Hypersil ODS; 100 x 2,1 ни; разнер частиц 3 микрона; номер по каталогу: 799160D-352

Скорость протока: 0,3 нл/нин
Температура: комнатная
Вводимый объем: 1 мкл
Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 365 нм
Настройка флуориметрического детектора: возбуждающая длина волны: 365 нм, возбужденная длина волны: 455 нм

**Затруднения:** Афлатоксины крайне чувствительны к свету. Обычный анализ выполняется в темной комнате. Любое воздействие дневного света приводит к разрушению анализируемого вещества. Предпочтительно хранение образцов и стандартов в холодильнике. Об афлатоксине В1 известно, что он является одним из наиболее канцерогенных веществ.

**Советы и преинущества**: Получение производных до введения образца в колонку может повысить чувствительность флуориметрического детектора. Кроме того, возможно и получение производных после разделения на колонке (но для этого потребуется второй изократичсский насос). Йод, используемый в качестве реактива для получения производных (после разделения на колонки) дает наивысшую чувствительность обнаружения. Перед анализом приходится проводить трудоемкую подготовку образца (поскольку, во многих случаях, имеющийся в матрице образца жир мешает разделению в высокоэффективном жидкостном хроматографе).

Экстрагирование углекислотой при сверхкритических условиях может заменить трудоемкую подготовку образца (описанную выше). Этот подход сократит продолжительность анализа и снизит риск для оператора. Метод такого экстрагирования из матриц жирных образцов все еще не разработан.

**Литература для справок: 1, 23**

**Масс-спектрометрическая идентификация афлатоксинов**

Прибор: Масс-спектрометр, оснащенный приставкой Therroospray (дающей возможность подключения жидкостного хроматографа)

Соответствующие методу параметры: Настройка, выполняемая вручную по массе 367 (соответствующей присоединению гликоля) Температура источника: 250°С Температура квадруполя: 120°С Режим регистрации индивидуальных ионов: 312 для В1, 314 для В2, 328 ДЛЯ GI, 330 ДЛЯ *G2* Время простоя на каждой массе: 600 мсек Напряжение на электронном умножителе: 2500 В Режим обнаружения ионов: регистрация отрицательных ионов Температура канала приставки Therroosprgay; 95°С Нить накала: включена

**Масс-спектрограмма ( соответствующая идентификации афлатоксина В1 ):**

**Советы и преимущества:** Опознание по иасс-спектрограммам считается наиболее надежным и независимым средством (которым можно пользоваться при получении разделении методом высокоэффективной жидкостной хроиатогрдфии).

**Литература для справок: 23**

### 3.2.3. Охратоксин

Охратоксин может продуцироваться различными грибками (такими, как Aspergillus и Penicillium) и обнаруживаться в некоторых пищевых продуктах. Люди могут быть подвержены действию этого токсина, если потребляют в пищу продукты из свинины и из непросеянной муки. Специальных пределов содержания этого токсичного вещества не установлено, но необходимость следить за его отсутствием вытекает из статьи 36 договора, заключенного при объединении стран в Европейское экономическое общество. Каждой страной устанавливаются собственные стандарты, соответствующие национальным законам, запрещающим продавать пищевые продукты, содержащие токсины.

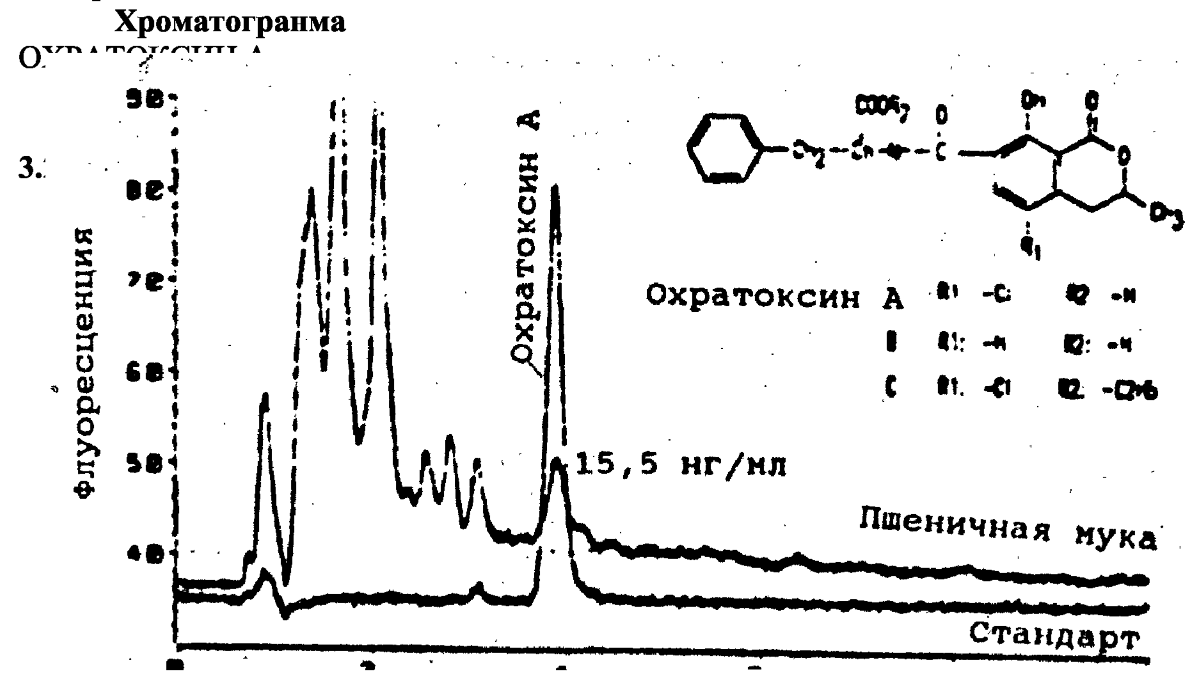
**Вещество**: Охратоксин А

**Подготовка образца**: 30 мл 2 М НС1 в 50 мл 0,4 М раствора хлористого магния добавляют к 20 г измельченного и перемешанного образца. После гомогенизации, добавляют 100 мл толуола и интенсивно встряхивают в течение 60 минут. Суспензия центрифугируется и 50 мл толуолового супернатанта пропускают через предварительно кондиционированный патрон Sop-Pack, заполненный силикагелем. Патрон промывается двумя 10 мл аликвотами гексана, 10 мл смеси толуола с

ацетоном (95:5)и 5 мл толуола. Охратоксин А элюируется 2 аликвотами по 15 мл толуола с уксусной кислотой (9:1) и высушивается при 40^С. Остаток растворяется 1 мл подвижной фазы и фильтруется.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей, флуориметрическим детектором

**Хроматограмма**




**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: LiChrospher 100 RP 18; 125 x 4 мн; размер частиц 5 микрон
Подвижная фаза: 2% (объемных) уксусной кислоты в смеси аце-тонитрил/вода ( 1 : 1 )
Скорость протока: 1 мл/мин
Температура: 40°С
Вводимый объем: 20 мкл
Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 236 нм
Настройка флуориметрического детектора: возбуждающая длина волны: 247 нм
возбужденная длина волны: 480 нм

**Затруднения:** Степень извлечения сильно зависит от матрицы образца. Приходится определять и эту степень (за счет искусственной добавки в образцы).

**Советы и преимущества**: Результат может быть подтвержден получением производного вещества из охратоксина А (за счет реакции с 14% [по соотношению объемов] раствором трехфтористого бора в метаноле); см. публикацию 23.

**Литература для справок**: 1, 7, 23, 24, 25

### 3.2.4. Зеараленон

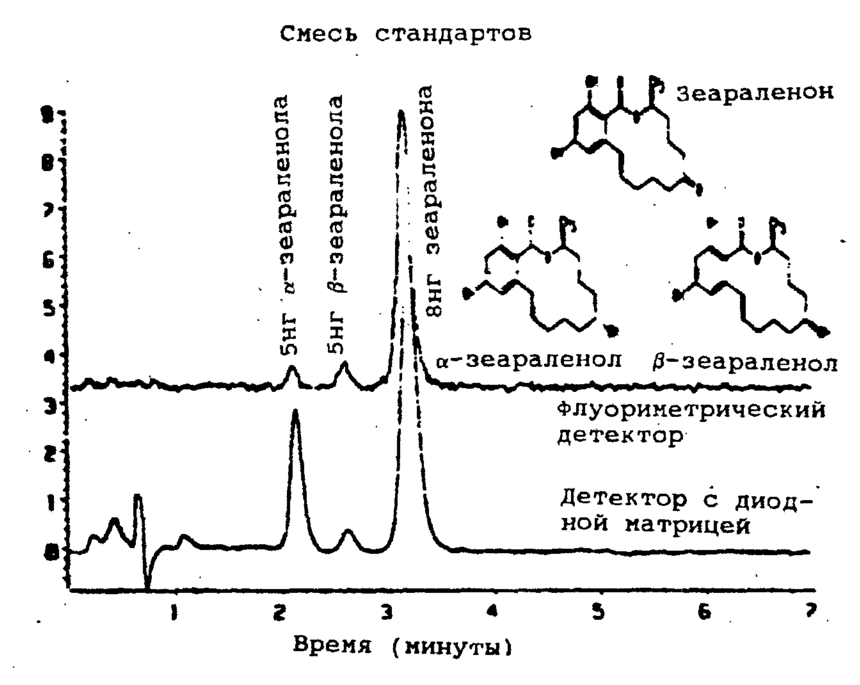
Зеараленон - микотоксин эстрогенного действия, вырабатываемый грибком Fasariurn, встречающимся (главным образом) в кукурузе и зерновых культурах.

**Вещество**: Зеараленон

**Подготовка образца**: Эеараленон, афлатоксины и охратоксин могут быть одновременно проэкстрагированы на патронах Sep-Pak с силикагелем. Образец наносится на патрон в виде толуолового экстракта. Патрон промывают толуолом, после чего эеараленон элюируют 10 нл смеси толуола с ацетоном (соотношение обьенов 95:5).

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, термостатом для колонки, устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей, флуо-риметрическим детектором

Хроматограмма:




**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Hypersil ODS RP 18; 100 x 2,1 мм; размер частиц 5 микрон; номер по каталогу: HP799250D-464

Подвижная фаза: вода/ацетонитрил/метанол (соотношение объемов 50/40/10)

Скорость протока: 0,5 мл/мин

Температура: 40°С

Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 236 нм (ширина полосы 20 нм)

Настройка флуориметрического детектора: возбуждающая длина волны: 236 нм возбужденная длина волны: 464 нм

**Советы и преимущества**; Для обеспечения чувствительного анализа и подтверждения по спектрограмме, рекомендуется пользоваться детектором с диодной матрицей. Однако, более высокую чувствительность дает обнаружение по способности к флуоресценции.

**Литература для справок**: 23,24

## 3.2.5. Патулин

### 3.2.5.1. Патулин

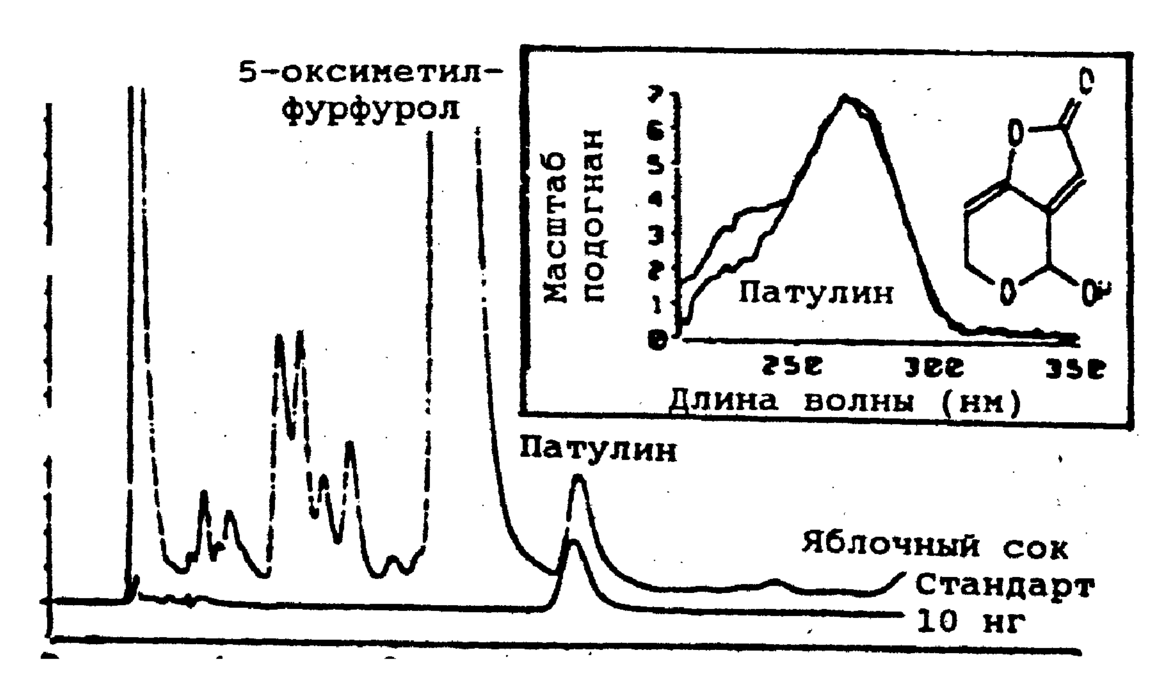
Патулин встречается, главным образом, во фруктах (конкретно, в яблоках). Он является метаболитом нескольких грибков. Чаще всего, это вещество анализируется в яблочных соках и в продуктах переработки яблок.

**Вещество:** Патулин

**Подготовка образца:** Известны два подхода. Фруктовые соки могут быть почищены на патроне Extrelut, после чего производится экстракция анализируемого вещества на колонке с силикагелем, элюирование из которой (перед дальнейшим хроматографическим анализом) обеспечивается смесью толуола с этилацетатом (3:1). Второй подход сводится к экстрагированию этилацетатом, после чего производится промывка 14% водным раствора карбоната натрия (указан весовой процент). После испарения этилацетата при 40°С, остаток растворяют в смеси метанола с этилацетатом (9:1).

**Прибор;** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, термостатом для колонки, устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей, флуориметрическим детектором

**Хроматограима:** АНАЛИЗ ПАТУЛИНА (стандарт и образец яблочного сока)




**Соответствующие методу параметры**:
Колонка: Superspher RP 18; 125 x 4 ни; разнер частиц 4 ник-рона; номер по каталогу: HP799250D-464
Подвижная фаза: вода/ацетонитрил(соотношение объемов 95/5)
Скорость протока: 0,6 нл/нин
Температура: 40°C
Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной патрицей): 270 нм

**Затруднения:** Основной сложностью при анализе содержания патулина в продуктах из яблок (соке, пирогах и т.д.) является высокое содержание 5-оксиметилфурфурола (вещества, пик которого близок к пику патулина и которое поглощает свет на той длине волны, которая используется при регистрации). Разделение этих двух веществ получали на колонке с силикагелем, и на колонке с диол-фазой.

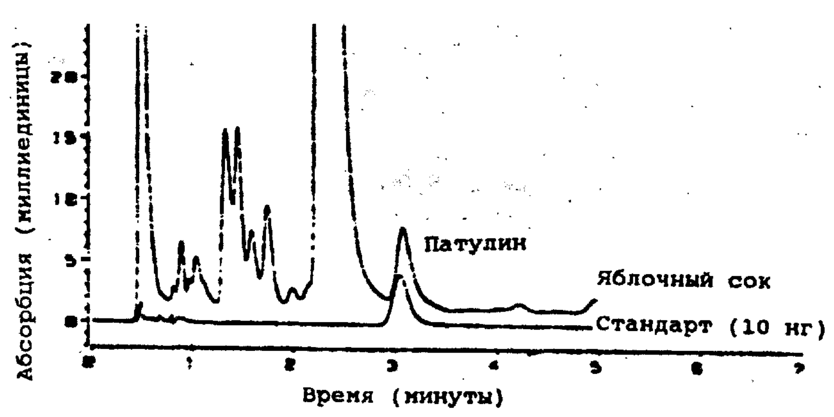
**Советы и преимущества**: При работе с улучшенными сорбентами с обращенной фазой (например, при работе с колонками Spherisorb RP 13; размер частиц 5 микрон), разделение может быть получено в градиентном режиме (от 5% до 100% ацетонитрила). -
**Литература для справок**: 23, 24, 25, 113

### 3.2.5.2. Патулин

**Вещество:** Патулин

**Подготовка образца**: Известны два подхода. Фруктовые соки могут быть почищены на патроне Extrelut, после чего производится экстракция анализируемого вещества на колонке с силикагелем, элюирование из которой (перед дальнейшим хроматографическим анализом) обеспечивается смесью толуола с этилацетатом (3:1). Второй подход сводится к экстрагированию этилацетатом, после чего производится промывка 14% водным раствора карбоната натрия (указан весовой процент). После испарения этилацетата при 40°C, остаток растворяют в смеси метанола с этилацетатом (9:1).

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, термостатом для колонки, устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны) или детектором с диодной матрицей




**Соответствующие нетоду паранстры**:
Колонка: LiChrospher Diol; 125 x 4 ни; размер частиц 4 микрона
Подвижная фаза: гексан/изопропанол (соотношение объемов 95/5)
Скорость протока: 0,6 мл/нин
Температура: 40°C
Вводимый объем; 1 мкл
Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 270 нм

**Затруднения**: Основной сложностью при анализе содержания патулина в продуктах из яблок (соке, пирогах и т.д.) является высокое содержание 5-оксиметилфурфурола (вещества, пик которого близок к пику патулина и которое поглощает свет на той длине волны, которая используется при регистрации). Разделение этих двух веществ получали на колонке с силикагелеми на колонке с диол-фазой. Разделение 5-оксинетилфурфурола и патулина на уровне базовой линии показано в публикации 23.

**Советы и преимущества**: При работе с улучшенными сорбентами с обращенной фазой (например, при работе с колонками Spherisorb RP 18; размер частиц 5 микрон), разделение может быть получено в градиентном режиме (от 5% до 100% ацетонитрила).

**Литература для справок**: 23, 24, 25, 113

### 3.2.6. Пестициды

Всемирные программы по контролю за содержанием пестицидов привели к ужесточению требований, предъявляемых к пищевым продуктам (поскольку у людей сложилось мнение, что некоторые продукты небезопасны).

Пестициды подразделяются (согласно областям их применения) на следующие группы: инсектициды, гербициды, фунгициды, моллюскициды, акарициды, нематициды, реппеленты, родентициды. К используемым химическим структурам относятся хлорсодержащие органические соединения углеводов с фосфором, карбаматы, содержащие мочевину производные хлорфеноксикарбоновых кислот, содержащие триазин органометаллические комплексы, полихлорированные дифенилы.

Европейские указания, ограничивающие предельное содержание этих веществ, действуют в большинстве стран Европы. Поэтому, наводите справки в национальных законодательных требованиях. Не должно быть превышено допустимое предельное содержание подобных веществ. Те вещества, которые неупомянуты в списках, запрещены. Национальные законодательные требования часто различаются как по перечням, так и по указываемым количествам. Импорт продуктов, содержащих эти вещества в количествах свыше пределов, оговоренных в национальных требованиях, должен быть прекращен (согласно статье 36 договора, заключенными странами при вступлении в Европейское экономическое общество).

Анализ фунгицидов (таких, как дитиокарбаматные) часто производится согласно методу, предложенному Кеппелем. Остаточные количества определяются после гидролиза этих веществ, в ходе которого образуется CS, количественная оценка содержания которого обеспечивается методами спектроскопии после образования комплексов с ацетатом меди. Этот способ быстр и требует малой оснащенности оборудованием. Пестициды часто идентифицируются и количественно опре-

деляются с помощью методов масс-спектрометрии (в частности, при пользовании комплексом "газовый хроматограф - масс-спектрометр" и "жидкостный хроматограф - масс-спектрометр")

Для обеспечения точного, эффективного и экономичного анализа остаточных количеств в пищевых продуктах, используются несколько типов аналитических приборов. Например, можно воспользоваться высокоэффективным жидкостным хроматографом, если вещества не летучи и не стойки к нагреву. Жидкостная хроматография дает возможность анализа большинства классов веществ. При пользовании газовой хроматографией, могут отмечаться некоторые сложности, связанные с эксплуатацией детектора соединений азота и фосфора.

### 3.2.6.1. Пестициды

**Вещества**: алдрин, аметрин, амидотион, атразин, азинфос-этил, азинфос-метил, азипротрин, бромацил, бромофос, каптафол, каптан, карбофенонтион, хлортал, хлорфенвинфос, хлорпирифос, ДДД, профенофос, винслозолин, хинтозен

**Подготовка образца**: 50 г овощной массы заливаются 100 мл ацетона; производится экстрагирование двумя аликвотами по 10 мл дихлорметана. Очистка обеспечивается на стеклянной колонке, заполненной 0,5 г силикагеля и I г угольного порошка; элюирование производится 15 мл смеси дихлорметан: толуол: ацетон. После выпаривания досуха, образец разводится гексаном и разделяется в газовом хроматографе на полярной колонке QFI и неполярной колонке SE-30. Обнаружение производится электронозахватным детектором.

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный электронозахватным детектором.

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: кварцевая колонка, имеющая длину б футов (1,8 н) и внутренний диаметр 1/4 дюйма (6,35 мм); 3% SE-30; 80-100 меш Температура колонки: 210°C Температура устройства для введения образца: 230°C Температура термостата: *210°C* Температура головки детектора: *210°C* Газ-носитель: гелий; 30 *мл/пин* Поддувочный газ: смесь аргона с метаном . Вводимый объем - 2 нкл

**Затруднения**: Для каждого класса пищевых продуктов должна определяться степень извлечения

**Советы и преимущества**: Время удерживания может достигать 15 минут. Степень извлечения для 34 пестицидов попадает в диапазон от 70 до 105%. Модифицированный метод может обеспечивать анализ 75 пестицидов, но его использование связано с большими затратами растворителей и времени.

В публикации 29 описаны 2 других набора параметров, соответствующих методу газовой хроматографии. Согласно одному из этих случаев, регистрация производится с помощью детектора соединений азота и фосфора. Некоторые из специалистов сообщают о затруднениях, испытываемых при использовании такого детектора для анализа пестицидов. Эта причина была одной из нескольких для перехода к методу высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В публикации 34 описан другой способ очистки образца. Согласно описанному подходу, используется метод гель-проникающей хроматографии для быстрой, эффективной, в значительной степени автоматизированной очистки.

**Литература для справок; 26,** 27, 23, 29, 30, 31, 32, 33, 34

### 3.2.6.2. Неорганический бронид

**Вещества**: Неорганический бронид **Салат-латук; свежие овощи и фрукты.**

**Подготовка образца:** Нарежьте образец на кусочки и гомогенизируйте в миксере. Избегайте утечки сока, поскольку в нем часто содержится большинство бромида. Перенесите 5 г суспензии образца в коническую колбу на 100 мл.

Зерновые культуры, высушенные овощи, фрукты **и грибы:** Мелко измельчите эти материалы. Перенесите 1 г в в коническую колбу на 100 мл.

**Получение производного вещества**:

Добавьте 5 мл. 4 н. (по отношению объемов) водного раствора окиси этилена к 5 г суспензии образца. В случае работы с порошковый сухим материалом, добавьте 10 мл того же самого реактива. Подкислите добавлением 1 мл 6 н. серой кислоты.

**Экстрагирование:** Добавьте 50 мл этилацетата и 4 г сульфата аммония к суспензии с подкисленным образцом. Встряхивайте в течение 1 минуты. Дайте выстояться в течение 20 минут (время

от времени встряхивая). Перенесите аликвотное количество 10 мл супернатанта в пробирку; добавьте около 0,5 г безводного сульфата натрия и хорошо встряхивайте.

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный электронозахватным детектором

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: из стекла пирекс; 150 см х3 нм; заполненная 10% карбоваксом 20М на хромосорбе W HP; 100-200 неш Температура колонки: 130°С Температура устройства для введения образца: 200^С Температура головки детектора: 250°С Газ-носитель: гелий; 40 см/сек • Вводимый объем: 1 мкл

**Затруднения**: Избегайте утечки сока, поскольку в нем часто содержится большинство бронида.

**Советы и преимущества**: Должно обеспечиваться вычитание результата холостой разгонки. Для каждой матрицы образца следует определять степень извлечения.

**Литература для справок**: 30

### 3.2.6.3. Триазиновые гербициды

**Вещества**: Дезэтилатразин, метоксурон, гексазинон, симазин, цианазин, метабензтиазурон, х-портолурон, атразин, монолинурон, диурон, изопротурон, метобромурон, метазахлор, себутилазин, тербутилазин, линурон, метахлор

**Подготовка образца:** В зависимости от матрицы образца, подготовка к анализу может потребовать дополнительного этапа фильтрации pH образца, должен быть доведен (примерно) до 6-7 (уксусной кислотой). Твердофазное экстрагирование производится на патроне с фазой PR-18 (1 г материала в этом патроне достаточно для удерживания всех интересующих веществ из собранного образца воды объемом 500 мл). Патрон, промытый 5 мл метанола, кондиционируется 5-10 мл дважды перегнанной воды. После пропускания раствора образца, патрон промывается дважды перегнанной водой и просушивается. Элюирование обеспечивается ацетонитрилом. После выпаривания, образец разводится смесью воды с ацетонитрилом (8:2).

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hypersil ODS; 100 х 2,1 мм; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А - вода растворитель В - ацетонитрил

Градиент: 0 мин 20%В 10 мин 3О%В 26 мин 42%В 34 мин 60%В 39 мин 100%В Скорость протока: 0,21мл/мин

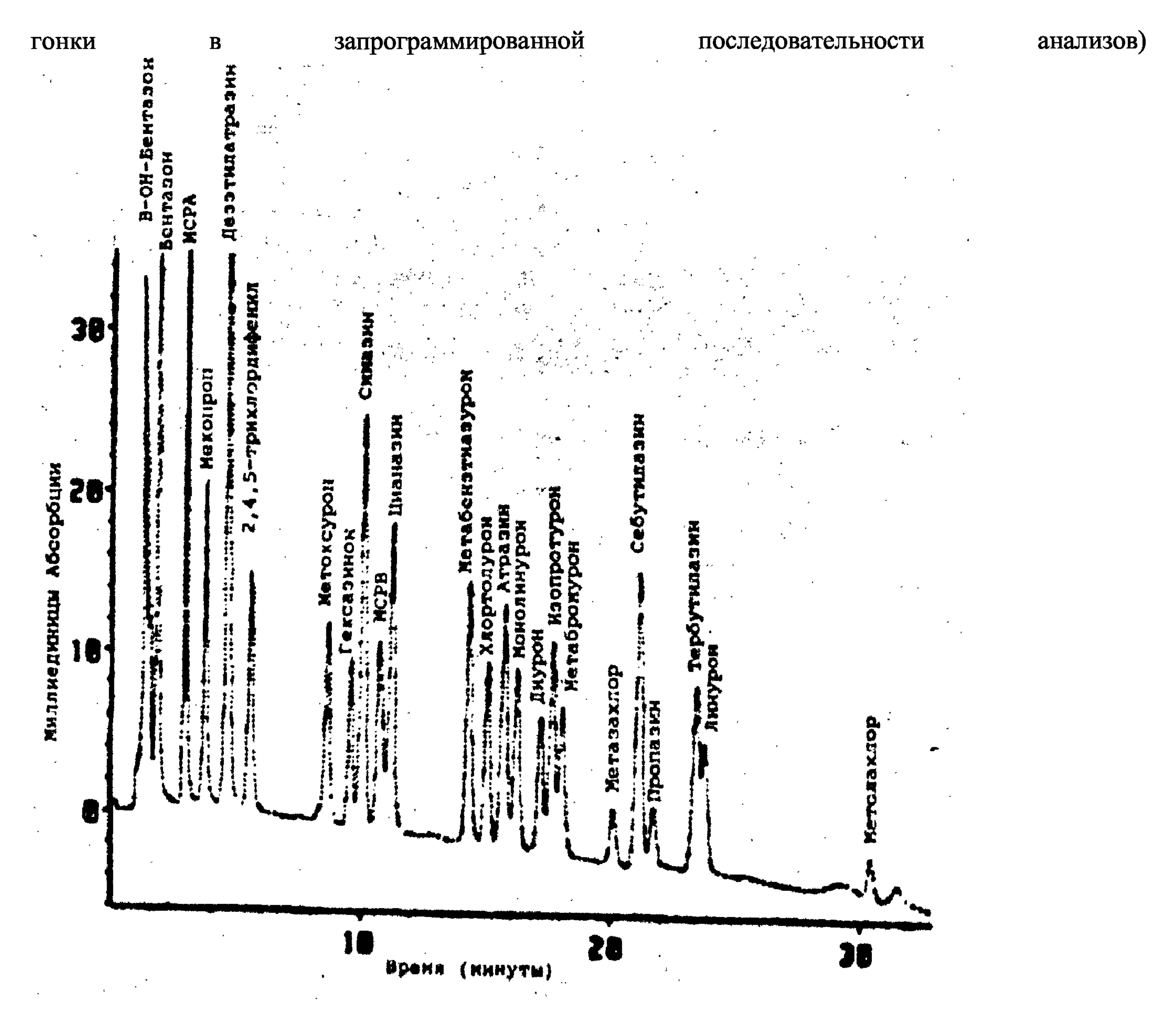
Вводимый объем: 10 - 100 мкл

Используемые для обнаружения длины волн: А: 230 нм (для триазинов) В: 245 нм (для фенилкарбаматных пестицидов) С: 214 нм (для производных анилина)

**Затруднения:** При концентрировании образца концентрируются не только интересующие вещества, но и все те, которые характеризуются тем же самым сродством к материалу в патроне для твердофазного экстрагирования. Эти дополнительные вещества могут мешать разделению пестицидов.

Советы и преимущества: При пользовании колонками с малым внутренним диаметром, значительно сокращается расход подвижной фазы. Благодаря этому факту можно заставлять жидкостной хроматограф работать без надзора оператора в течение нескольких дней (емкости стандартных бутылей с растворителями окажется для этого достаточно). Правильность опознания подтверждается результатами библиотечного поиска (автоматически выполняемого для каждой раз-

гонки в запрограммированной последовательности анализов)




### 3.2.6.4. Карбаматные пестициды

**Вещества**: Алдикарба сульфоксид, алдикарба сульфон, оксамил, метомил, 3-оксикарбофуран, алдикарб, карбофуран, байгон, карба-рил, метиокарб

**Подготовка образца:** Для растений используется следующая процедура: любую грязь и посторонние частицы, не имеющие отношения к растению, приходится удалять вручную. Промывка водой запрещена! После взвешивания материала, который использовался бы в пищевых целях, образец гомогенизируется. Экстрагирование производится водой. Анализ выполняется сразу же после подготовки образца.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей, системой для получения производных уже после разделения на колонке, флуориметрическим детектором.

**Соответствукщие методу параметры**:

Колонка: с обращенной фазой RP-18; 250 х4,б им

Подвижная фаза: растворитель А - вода растворитель В - метанол

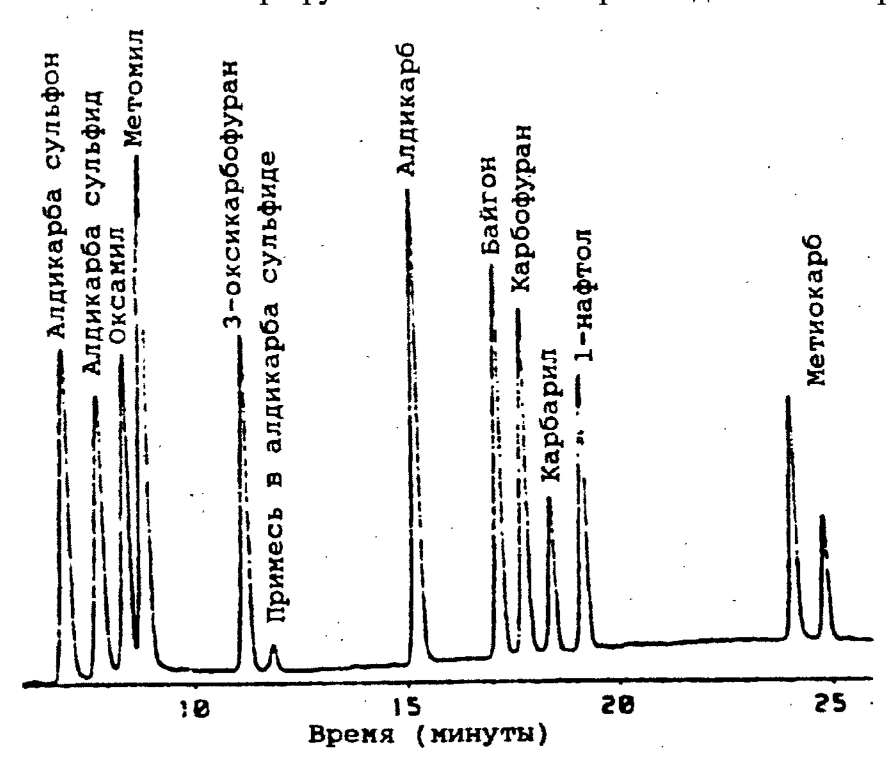
Градиент: О нин - 25%В 25 мин -75%В

Скорость протока: 1 мл/мин

Насос, подающий реактивы для получения производных; скорости протока (для каждого канала): 0,5 мл/мин Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметри-ческого детектора ): Возбуждающая длина волны 229 нм; ширина щели 25 нм Возбужденная длина волны 425 нм;

ширина щели 50 нм Отсекающий свет фильтр: 335 нм Время отклика детектора: 4 сек Коэффициент усиления фотоумножителя: 12

**Затруднения**: При анализе образцов пищевых продуктов требуется экстрагирование водой. Если воду характеризует кислый pH, могут отмечаться большие потери карбамидных пестицидов (из-за образования $CS_2$ ). Возможность такого разрушения заставляет производить анализ сразу же




после подготовки образца.

**Советы и преимущества**: Согласно методу 531.1, утвержденному ЕРА (Агентством охраны окружающей среды), рассмотренный выше подход используется для анализа содержания карбаматных пестицидов в подпочвенных водах. Образец воды непосредственно вводится в хроматограф. Фильтрация может привести к затруднениям, связанным с адсорбцией веществ на материале фильтра.

Обычно, анализ карбаматных пестицидов производят более часто соответственно методу, предложенному Кеппелон. Такой подход быстр и требует очень малой оснащенности оборудованием. Причиной перехода к использованию метода высокоэффективной жидкостной хроматографии яьлялось обеспечение более высоких воспроизводимости и надежности.

**Литература для справок**: 116, 117, 118, 119, 31, 121

### 3.2.6.5. Глифосат

Содержание этого вещества приходится контролировать в питьевой воде согласно методу 547, утвержденному ЕРА (Агентством охраны окружающей среды). В США, количество гифосата в питьевой воде не должно быть более 6 мкг/л; в странах общего рынка - не более 0,1 мкг/л.

**Вещества**: Глифосат, аниномегилфосфоновая кислота

**Подготовка образца**: Получение производных до колонки обеспечивается благодаря реакции с FMOC (1 мг/мл в ацетонитриле) в боратном буфере (0,4 н.; pH 10,4) при тщательном перемешивании. Описанный здесь метод основан на получении производных уже после разделения на колонке. Используется дополнительный (подающий реактивы) насос. Скорость протока окисляющего реактива (OCL): 0,3 мл/мин; скорость протока реактива, используемого для получения производных (диальдегид ортофталевой кислоты): 0,3 мл/мин

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, системой для получения производных уже после разделения на колонке, флуориметрическим детектором.

**Соответствующие нетоду параметры:** Колонка: 150 х 4 мм; катионообненная, форма $K^+$ от фирмы Pickering; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А - 5 мМКНрРОд (рН=2,0) растворитель В - 5 мМ КОН

Градиент: до 15-й мин - 0%В на 17-й мин - 100%В

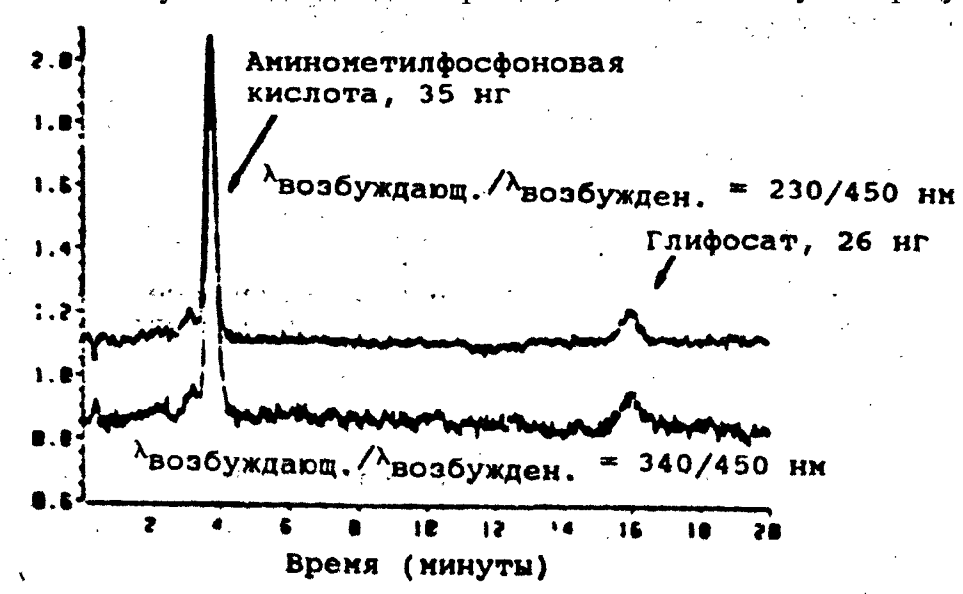
Скорость протока: 0,4 мл/мин

Вводимый объем: 500 мкл (стандартный)

Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметри-ческого детектора): Возбуждающая длина волны 230 нм Возбужденная длина волны 465 нм Отсекающий свет фильтр: 370 нм

**Затруднения**: Получение производных до разделения на колонке может быть связано с дополнительными затруднениями, обусловленными присутствием мешающих аминокислот в матрице образца. Для получения производных глифосфата уже после разделения на колонке (окисление и последующая реакция с диальдегидом ортофталевой кислоты) требуется дополнительное оборудование. Преимуществом такого подхода является более высокая селективность.

Этот способ лучше подходит для образцов, имеющих сложную матрицу.




**Советы и преимущества**: Существует и другой способ получения производных до разделения на колонке, описанный в научных публикациях. Чувствительность при таком подходе несколько выше, а оборудование проще. Нужен лишь автоматический пробоотборник HP 1050 (79855А). Получение производных до разделения на колонке обеспечивается пробоотборником автоматически. Однако, при получении производных после разделения на колонке удается добиться более высокой селективности. Этот выигрыш очень важен для анализа пищевых продуктов, в матрице которых могут иметься аминокислоты (тоже вступающие в реакцию до разделения на колонке и мешающие обнаружению глифосата). Предел обнаружения: 1 нилли-ардная доля; погрешность воспроизводимости времени удерживания за 10 разгонок: 0,8%.

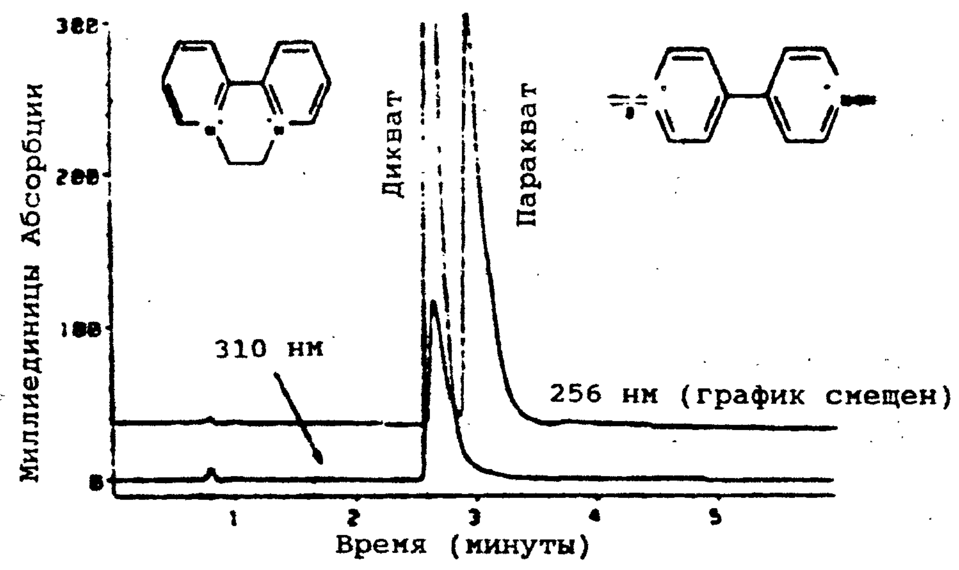
Литература для справок: 120, 121

### 3.2.6.6. Дикват, паракват

**Вещества**: Паракват, дикват

**Подготовка образца**: Обычно, содержание этих веществ контролируется в подпочвенных водах и питьевой воде. 250 мл образца подвергают твёрдофазному экстрагированию на патроне с фазой С-18. Экстрагирование обеспечивается подвижной фазой, используемой для разделения в жидкостной хроматографе.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2. растворителей), устройством для введения образца, спектрофотомстрическим детектором (с изменяемой длиной волны) или детектором с диодной матрицей.




**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Hypersil ODS; 100 х 2,1 нм; размер частиц 5 микрон (номер по каталогу фирмы "Хьюлетт-Паккард": 799160D-552)

Подвижная фаза: 0,1% раствор гексансульфокислоты (по объему), 0,35% триэтиламна; доводка pH до 2,5 (фосфорной кислотой)

Скорость протока: 0,4 мл/мин

Температура: комнатная

Вводимый объем: 10 мкл

Используемые для обнаружения длины волн: A: 256 нм (ширина полосы 10 нм); контрольная длина волны 450 нм (ширина полосы 100 нм) B: 310 нм (ширина полосы 10 нм); контрольная длина волны 450 нм (ширина полосы 100 нм).

**Затруднения**: Для идентификации должен быть использован (по меньшей мере) еще один количественный метод. Регистрация детектором с диодной матрицей дает возможность снимать спектрограммы автоматически. Помимо опознания по времени удерживания, предоставляется возможность спектрального подтверждения.

**Советы и преимущества**: За счет различия спектрограмм интересующих двух веществ, обнаружение должно производиться на двух разных длинах волн (чтобы обеспечивалась максимальная чувствительность). Употребление колонок с малым внутренним диаметром значительно сокращает расход растворителя. Для оценки стабильности метода, проводились долговременные проверки. При введении 100 нг образца, отмечалась погрешность площадей пиков (по относительному стандартному отклонению) менее 1%. Подобные подсчеты могут быть произведены в автоматическом режиме для каждой обрабатываемой серии образцов (системой обработки данных HPLC Chemo-Station, Серия DOS).

**Литература для справок**; 122

### 3.2.6.7. Меркаптобензтиазол

**Вещество:** Меркаптобензтиазол

**Подготовка образца**: Подготовка образца сводится к концентрированию из водного раствора (методом жидкожидкостного экстрагирования хлористым метиленом). Экстракт должен быть промыт водой (по меньшей мере) дважды.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hypersil ODS; 100 х 2,1 мм; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А - вода растворитель В - ацетонитрил А:В= 63:35

Скорость протока: 0,21 мл/мин Температура: 40°С

Вводимый объем: 20 мкл

Используемая для обнаружения длина волны: 317 нм (ширина полосы 40 нм); контрольная длина волны 550 нм (ширина полосы 100 нм)

**Затруднения:** Метод анализа меркаптобензтиазола был опубликован ЕРА (Агентством охраны окружающей среды). В публикации указывается, что анализ должен выполняться с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и (по меньшей мере) одного дополнительного количественного метода.

**Советы и преимущества**: Дополнительным методом (дополняющим опознание по времени удерживания) является регистрация спектрограмм с помощью детектора с диодной матрицей. Этот детектор способен обнаруживать и идентифицировать количества вещества с 15 нг (и даже более малые).

**Литература для справок: 123, 124**

### 3.2.6.8. Пестициды

**Вещества**: а-гексахлорциклогексан, гексахлорбензол, β-гекса-хлорциклогексан, у-гексахлорциклогексан, хинтозен, 5-гексахлор-циклогексан, гептахлор, алдрин.октахлорстирол, гептахлорзло-ксид, о,п-ДДЕ, сг-эндосульфан, диэльдрин, р,р-ДДЕ, эндрин, нит-рофен, а-эндосульфан, ДДД, р,р-ДДТ, метоксихлор, мирекс

**Подготовка образца**: 50 г овощной массы заливаются 100 мл ацетона; производится экстрагирование двумя аликвотами по 10 мл дихлорметана. Очистка обеспечивается на стеклянной колонке, заполненной 0,5 г силикагеля и 1 г угольного порошка; элюирование производится 15 мл смеси дихлорметан: толуол: ацетон. После выпаривания досуха, образец разводится гексаном и разделяется в газовом хроматографе.

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный насс-селективным детектором

Соответствующие методу параметры: Колонка: кварцевая капиллярная, HP5-MS; 30 м х 0,25 нм; толщина пленки фазы 0,25 микрона Температура термостата: 80°С в течение 2 мин. со скоростью 30°С/мин до 180°С со скоростью 5°С/мин до 260°С со скоростью 30°С/мин до 300°С Температура устройства сопряжения с масс-селективным детектором: 280°С Температура устройства для введения образца: 250°С Газ-носитель: гелий; 25 фунтов на кв. дюйм (1,75 мин), после чего 13 фунтов на кв. дюйм при температуре 240 С (режим обеспечения постоянной скорости протока) Введение без деления образца; время переключения клапана, управляющего продувкой прокладки: 2 мин.; вставка с двойной конической частью

**Параметры, соответствующие масс-селективнону детектору:** Масс-селективный детектор HP 5972А; автоматическая настройка на максимальную чувствительность Напряжение на электронном умножителе: 2388 В Режим сканирования: от 50 до 420 атомн. ед. массы (примерно,. 1,5 сканирования за секунду) Режим регистрации индивидуальных ионов: 3 - б ионов; продолжительность периода простоя: 65 - 140 м/сек

**Советы и преимущества:** Реконструированная хроматограмма для 438 фтг мирекса показала, что возможна идентификация веществ даже при таком низком уровне концентраций. Получают исключительно качественные спектрограммы даже для столь сложных химических соединений, как алдрин. При пользовании таким аналитическим оборудованием можно идентифицировать и количественно определять содержание фосфороорганических пестицидов (для чего прибору придется задать слегка отличающиеся параметры). Даже при очень сложной матрице образца (такой, как типичная для апельсинового сока), можно распознавать 10-пкг количества фосфорорганических пестицидов.

**Литература** для **справок:** 154

## 3 .2.7. Полиароматические угдеводороды

Полиароматические углеводороды (как загрязнители) встречаются повсюду; пищевые продукты не могут быть исключением. Кроме того, они могут появиться при конкретных видах технологической обработки (такой, как обжаривание). Очень хорошим примером является обработка солода, выполняемая при высокой температуре: в этих условиях, реакция белков с углеводами может привести к получению полиароматичсских углеводородов. Солод часто продается в качестве компонента лечебного питания и состав его приходится контролировать, чтобы покупатели не приобре-

тали загрязненный продукт. Предельное содержание таких углеводородов в мясе в 10 раз ниже, чем в солоде.

**1. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии**:

а) на колонке RP ODSSil-X с внутренним .диаметром 2,6 нм; изократическое элюирование в течение 5 минут смесью воды с аце-тонитрилом (6:4), после чего градиентное элюирование за 25 минут до 100% ацетонитрила при скорости протока 0,5 мл/мин; полное разделение обеспечивается (примерно) за 40 минут; предел обнаружения: 2,8 мкг/л или

б) на колонке Supelcosil LC-PAH (длина 150 мм; внутренний диаметр 4,6 мм); градиентное элюирование от смеси воды с аце-тонитрилом (40:60) до 100% ацетонитрила за 20 минут; этот вариант анализа менее продолжителен (около 25 минут); за счет применения флуориметрического детектора удается повысить чувствительность в 1000 раз. Образцы должны храниться (до экстрагирования) не более 7 дней, поскольку известно, что полиароматические углеводороды способны разрушаться под воздействием света. Необходима предварительная промывка колонки с фазой, изготовленной на основе силикагеля, пентаном.

**2. Метод газовой хронатографии:** экстракт должен быть сконцентрирован до 10 мл (для обеспечения максимальной чувствительности). Разделение производится на колонке Chromosorb, W-AW-DCMS (100 меш) с 3% покрытием фазой OV-17 (таким материалом набита стеклянная колонка с длиной 1,8 м и внутренним диаметром 2 мм). Газ-носитель: азот; скорость протока 40 мл/мин; температура термостата: 100°С в течение 4 минут, затем изменение со скоростью 8°С/мин до 280°С. Времена удерживания: до 45 минуу. Рекомендуется идентификация с помощью масс-спектрометра.

Эти методы описаны более подробно в приводимом далее тексте. На стр. 60 дается непосредственное сравнение результатов, получаемых при пользовании колонками с малым внутренним диаметром и колонками со стандартным диаметром. Работа с колонками, имеющими малый внутренний диаметр, сокращает расход растворителя на 2/3 (по сравнению с расходом, типичным для сопоставляемых колонок). В то же время, может отмечаться и 3-кратное повышение чувствительности. Однако, для этого должен быть очень малым мертвый объем (на участке от колонки к детектору).

### 3.2.7.1. Полиароматичвсквв углеводороды

**Вещества**: Аценафтен, флурантен, нафталин, бенз(а)пирен, бенз (а) антрацен, бенз(Ь)флуорантен, бенз(k) флурантен, **хризен,** аценафтилен, антрацен, бенз (g,h,i) перилен, флуорен, фенантрен, дибенз(а,Ь)антрацен, индено(1,2,3-сс1)пирен, пирен

**Подготовка образца:** После тройного экстрагирования хлористым метиленом, образец концентрируется в концентраторе Кудерна-Даниш (или в другом устройстве), после чего обезвоживается над сульфатом натрия. В случае большинства матриц образца, необходима дополнительная очистка. После замены растворителя цикло-гексаном, аликвотное количество 2 мл может быть очищено элюиро-ванием пентаном с 10 г силикагеля, активированного хлористым метиленом. Полученный с помощью пентана элюент затем снова концентрируется (до объема менее 10 ил). Разделение и идентификация могут производиться как методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, так и методом газовой хроматографии.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей, флуориметрическим детектором.

**Соответствующие методу параметры** (при работе с хроматографом HP 1050):

Колонка: Vydac RP-18; 250 х 4,6 мм; 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А - вода растворитель В - ацетонитрил

Градиент: 2,5 мин - 60%В 12 мин - 90%В 20 мин - 100%В •

22,5 мин - 100%В ' 25 нин 6О^В '

Скорость протока: 1,5 мл/мин Температура; 28°С

Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 270 нм (ширина полосы 40 нм) Настройка флуориметрического детектора обеспечивается на длины волн, оптимальные для каждого вещества (см. таблицу, приведенную в публикации 126).

**Соответствуящяе методу параметры** (при работе с хроматографом HP 1090):

Колонка: Vydac RP-18; 250 х 2,1 мм; 5 микрон
Подвижная фаза: растворитель А - вода ' растворитель В - ацетонитрил
Градиент; 2,5 мин - 60%В 12 мин - 90%В 20 мин - 100%В 22,5 мин - 100%В , 25 мин 60%В Скорость протока: 0,42 мл/мин
Температура: 28°С Используемая для обнаружения длина волны (детектора с диодной матрицей): 270 нм (ширина полосы 40 нм) Настройка флуориметрического детектора обеспечивается на длины волн, оптимальные для каждого вещества (см. таблицу, приведенную в публикации 126).

**Советы и преимущества**: Анализ может производиться при пользовании любым из указанных вариантов оборудования. Хроматограф HP 1090, более приспособленный для работы с колонками, имеющими малый внутренний диаметр (с малым мертвым объемом и с более эффективным насосом), дает возможность снизить расход растворителя более, чем на 60%, и повысить чувствительность при том же самом вводимом объеме образца (по сравнению с системой, использующей стандартные колонки и позволяющей получить более высокую разрешающую способность).

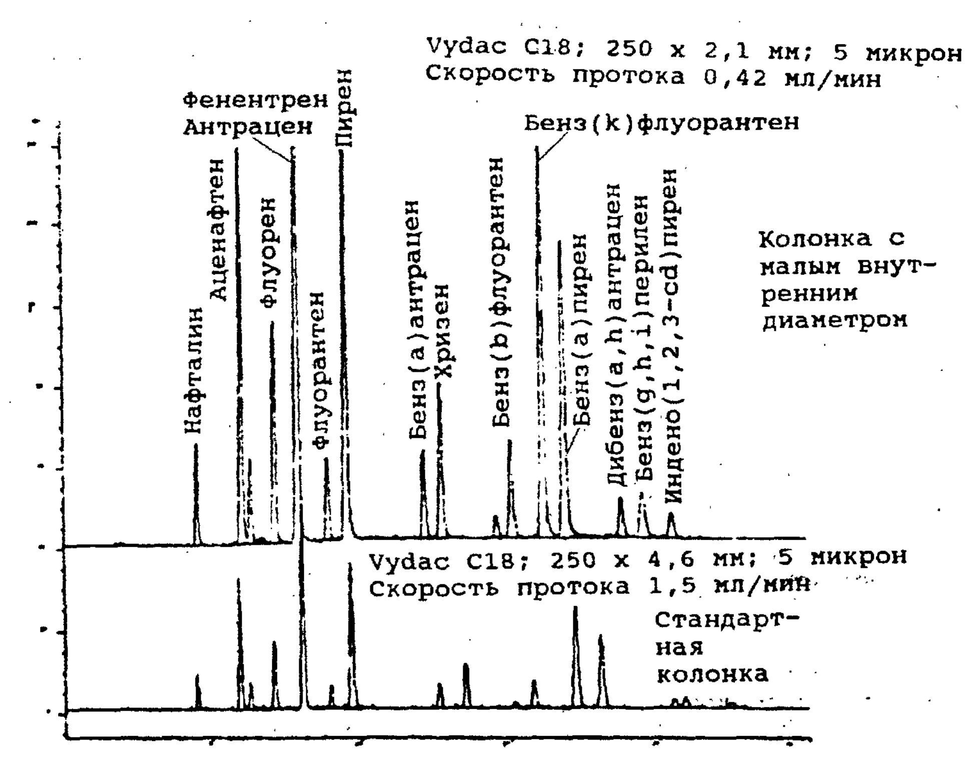
Если правильно подобраны режимы обнаружения флуориметрическим детектором, количественный анализ содержания полиароматических углеводородов обеспечивается воспроизводимо при концентрациях на уровне единиц пикограммов. По сравнению с сигналом, регистрируемым спектрофотометрическим детектором, при пользовании флуориметрическим детектором отношение сигнала к шуму (для анализируемого вещества) в 100 раз выше (из-за чего обнаружение в 100 раз чувствительнее).

Подготовка образца может производиться методом сверхкритического экстрагирования. Для получения более подробной информации о таком подходе, см. публикацию 126.
Литература для справок: 126, 127

Рекомендации по успешному выполнению анализа содержания полиароматических углеводородов

- Когда образцы загрязнены только следовыми количествами углеводородов, наибольшую чувствительность даст обнаружение по способности к флуоресценции (с запрограммированным переключением длин волн согласно настройке на ожидаемые вещества). Необходимо тщательное обезгаживание подвижной фазы (чтобы отклик флуориметрического детектора оказывался наибольшим).
- Регистрация детектором с диодной матрицей позволяет проверить достоверность опознания (с помощью спектральных 'данных) и чистоту пиков (если чувствительность этого детектора оказывается достаточной).
- Рекомендуется подключать детектор с диодной матрицей и флуориметрический детектор последовательно (в частности, для анализа содержания аценафтиленав ходе одной разгонки), чтобы удовлетворялись требования, сформулированные Агентством охраны окружающей среды (ЕРА) для анализа полиароматических углеводородов.

РАЗДЕЛЕНИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ




### 3.2.7.2. Полиароматические углеводороды

Целью описанного ниже альтернативного исследования был показ возможности чувствительного обнаружения полициклических ароматических углеводородов на уровне единиц пикограммов (размах на всю шкалу) и повышение чувствительности за счет регистрации выбранных ионов. Масс-спектрограммы, полученные при пользовании подобранным оборудованием, иллюстрируют малую фрагментацию интересующих углеводородов. Эта особенность облегчает обнаружение этого класса веществ в режиме регистрации полной спектрограммы, (в режиме сканирования) на уровне единиц пикограммов. Сложнее было бы определять содержание сильно фрагментируемых веществ (таких, как триазины) или многие галоидзамещенные пестициды (эндосульфан, эндрин).

**Вещества**: Нафталин, аценафтилен, аценафтен, флуорен, фенантрен, антрацен, флуорантен, пирен, бенз(а)пирен, хризен, бенз-(Ь)флуорантен + бенз (К) флуорантен, бенз (а) антрацен, инденопирен, дибенэ( a, h) антрацен, бенз (g,h,i) перилен

**Подготовка образца:** После тройного экстрагирования хлористым метиленом, образец концентрируется в концентраторе Кудерна-Даниш (или в другом устройстве), после чего обезвоживается над сульфатом натрия. В случае большинства матриц образца, необходима дополнительная очистка. После замены растворителя циклогексаном, аликвотное количество 2 мл может быть очищено элюированием пентанола с 10 г силикагеля, активированного хлористым метиленом. Полученный с помощью пентана элюент затем снова концентрируется (до объема менее 10 мл). Разделение и идентификация могут производиться как методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, так и методом газовой хроматографии.

**Прибор:** Газовый хроматограф, масс-спектрометр

1. Нафталин
2. Аценафтилен
3. Аценафтен
4. Флуорен
5. Фенантрен
6. Антрацен
7. Флуорантен
8. Пирен
9. Бенз (а) антрацен
10. хризен

II. Бенэ(Ь) флуорантен + 6еН3(k) флурантен

12. Бенз (а) пирен
13. Иденопирен
14. Дибен з ( а, h ) антрацен
15. Бенз(д,Ь,1)перилен

**Соответствувщие нетоду параметры:** Для газового хроматографа: Колонка HP5-MS; 30 м х 0,25 мм; толщина пленки фазы 0,25 микрона

Температура термостата: бО°С в течение 1 минуты со скоростью 15°С/мин до 300°С Температура устройства для введения образца (дающего возможность введения в капиллярную колонку с делением или без деления потока): 270° С. Температура устройства сопряжения с масс-спектрометром: 280°С Газ-носитель; гелий; 32,6' см/сек; 0,8 нл/мин; давление 6 фунтов на кв. дюйм при бО^С Введение образца без деления потока; время переключения клапана, управляющего продувкой прокладки: 1,5 мин Вводимый объем: 1 мкл

Для масс-спектрометра: Сканирование в диапазоне от 70 до 280атомн. ед. массы; порог 100; число выборок данных: 2' Режим регистрации индивидуальных ионов: 8 групп по 1 или по 2 иона (молекулярные ионы); время простоя от 70 до 150 м/сек **на** ион. Напряжение на электронном умножителе: 2400 В

**Советы и преимущества**: Для сравнения регистрируемых спектрограмм, можно пользоваться собранной Национальным институтом стандартов (NIST) библиотекой масс-спектральных данных (около 75 000 масс-спектрограмм). Получаемые спектрограммы показывают, что полиароматические углеводороды фрагментируются мало. Эта особенность облегчает обнаружение такого класса веществ в режиме регистрации полной спектрограммы (в режиме сканирования) на уровне единиц пикограммов. Сложнее было бы определять содержание сильно фрагментируемых веществ (таких, как триазины). Масс-спектрометр не способен различить различные изомеры полиароматических углеводородов. Из-за этого приходится пользоваться информацией о времени удерживания, чтобы точно опознать изомер.

**Литература для справок: 153**

### 3.2.8. Нитрозамины

Рассмотренный здесь метод дает возможность специфичного обнаружения этих канцерогенных веществ в присутствии других азотсодержащих химических соединений.

**Вещества:** Нитрозамины

**Подготовка образца:** Нитрозамины - летучие вещества, которые могут обнаруживаться непосредственно системой «парофазный автоматический пробоотборник - газовый хроматограф»

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный автоматическим па-рофазным пробоотборником.

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: HP-5; 15 м х 0,25 мм; с тонкой пленкой фазы Температура входного канала хроматографа: 210°С Температура колонки: 80°С в течение 1 минуты со скоростью 30°С/мин до 210°С Температура реактора: 740°С Газ-носитель: гелий; 12 фунтов на кв. дюйм Газ-реактант: водород; 35 нл/мин Поддувочный газ: гелий; 50 мл/мин Электролит: смесь н-пропанола с водой (50/50); скорость протока 0,7 нл/мин. Степень ослабления: 1*20

Советы и преимущества: Нитрозамины могут быть обнаружены в жареном на рашпере мясе. В частности, условия для реакции .жира с белками создаются тогда, когда мясо и жир вступают в непосредственный контакт с пламенем.

**Литература для справок: 41, 42, 43,44, 45, 46**

### 3.3. Остатки бактерицидных и лекарственных средств

Остаточные количества таких веществ в пищевых продуктах продолжают сильно беспокоить потребителей и правительство многих стран. Кроме того, забота об отсутствии остатков лекарственных средств в продуктах животного происхождения (мясо, яйца, молоко) оказывается сегодня важнейшей задачей для всех производителей пищевых продуктов. Антибиотики, средства химиотерапии применяются, главным образом, в птицеводстве (для лечения, про-филактики и стимуляции роста). В ряде стран приняты различные законодательные требования, запрещающие поставки населению животной продукции, загрязненной остаточным содержанием лекарственных средств (иногда наличие остатков считается совсем недопустимым). Поэтому при анализе интере-

сует, главным образом, чувствительность. Однако, совсем не сложно достигнуть необходимого предела обнаружения. Как правило, пользуются не одним лекарственным средством, из-за чего обнаруживаются "коктейли" (смеси различных лекарственных средств на очень малых уровнях концентраций.). Широкий спектр интересующих веществ заставляет подвергать тот же самый образец различным анализам (чтобы обеспечивалась возможность прослеживания всего исследуемого состава). Главной целью является разработка методов, дающих возможность обнаруживать вещества, относящиеся к многим классам. Возникает потребность и в автоматизированных методах анализа, дающих возможность специалистам, следящим за качеством пищевых продуктов, реагировать быстро. В идеальном случае, способ анализа должен способствовать обнаружению и метаболитов. Известно, что метаболиты лекарств часто могут обладать канцерогенными или мутагенными свойствами, следовательно, необходимы очень чувствительные и селективные методы (эти требования не обеспечиваются. такими традиционными подходами, как тонкослойная хроматография или простой спектральный анализ). Лишь современное оборудование, обеспечивающее подготовку образцов, идентификацию, качественную и количественную оценку за один цикл анализа, дает возможность решить поставленные задачи.

Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии - наиболее мощный подход к исследованию всех соответствующих классов веществ (дающий возможность автоматизировать и подготовку образца). Для идентификации часто требуется подтверждение иным видом детектора. С этой точки зрения, масс-спектрометрия дает специфичный способ регистрации, позволяющий уникально и надежно производить опознание и количественное определение. В состав одной комплексной системы могут входить детектор с диодной матрицей и масс-спектрометр. Таким образом, возможны идентификация и количественный анализ за одну разгонку при пользовании двумя независимыми принципами обнаружения.

(см, продолжение на следующей странице)

| Предельное содержание остаточных количеств лекарственных средств в тканях животных, яйцах и молоке, установленное для стран Общего рынка на март 1993 г. | | |
|---|---|---|
| Лекарственное средство | Предельное содержание | Объект |
| Сульфаниламид.. . | 100 мкг/кг | Мышцы, печень, почки, жир |
| Бензилпенициллин | 50 мкг/кг | Мышцы, печень, почки, жир |
| Аипициллин, амоксициллин | 4 мкг/кг | Молоко |
| Оксациллин, клоксациллин, | 300 нкг/кг | Мышцы, печень, почки, жир |
| диклоксациллин | 30 мкг/кг | Молоко |
| Ивермецитин | 15 нкг/кг | Печень (говядина, баранина) |
| | 20 мкг/кг | Жир (свинина, конина) |
| Предварительные ограничения | | |
| Сульфаниламид | 100 мкг/кг | Молоко (коровье, овечье, козье) |
| Триметоприм 50 мкг/кг Мышцы, печень, почки, жир, молоко | | |
| Нитрофуран 5 мкг/кг Мышцы, печень, почки, жир | | |
| Диметридазол 10 мкг/кг Мышцы, печень, почки, жир | | |
| Ронидазол 2 мкг/кг Мышцы, печень, почки, жир | | |
| Дапсон 25 мкг/кг Мышцы, печень, почки, жир | | |
| Тетрациклин | 600 мкг/кг | Почки |
| | 300 мкг/кг | Печень |
| | 200 мкг/кг | Яйца |
| | 100 мкг/кг | Мышцы, молоко |
| спирамицин | 300 мкг/кг | Печень (говядина, свинина) |
| | 200 мкг/кг | Почки (говядина, свинина) |
| | 50 мкг/кг | Мышца (говядина, свинина) |
| | 150 мкг/кг | Молоко (коровье) |
| Хлорамфеникол | 10 мкг/кг | Мышца, печень, почки, жир |
| Фебантел, фенбендазол, оксфендазол | 1000 нкг/кг | Печень |
| | 10 мкг/кг | Мышца, печень, почки, жир |

| | | |
|---|---|---|
| Левамизол молоко | 10 мкг/кг | Мышца, печень, почки, жир, |
| Азаперон | 100 мкг/кг | Почки |
| | 10 мкг/кг | Печень, мышца, жир каразолол |
| | 30 мкг/кг | Печень, почки |
| | 5 мкг/кг | Мышца, жир |

### 3.3.1 Малахитовый зеленый

Это профилактическое и терапевтическое средство используется для обработки пресноводных рыб (таких, как форель). Содержание малахитового зеленого в рыбе и в рыбных продуктах не должно превышать 0,01 миллионной доли. Исходя из токсичности этого средства, для идентификации и количественного анализа требуются более чувствительные методы, чем тонкослойная хроматография, Повышение чувствительности достигается с помощью метода высоко-эффективной жидкостной хроматографии; правильность опознания может быть подтверждена детектором с диодной матрицей.

**Вещество**: Малахитовый зеленый, лейкобаза малахитового зеленого, бриллиантовый зеленый, кристаллический фиолетовый

**Подготовка образца:** После гомогенизации, 10 г образца смешивают с 40 млацетонитрила, подкисленного перхлорной кислотой. Через 1 минуту, добавляют 10 мл дихлорметана и позволяют образцу экстрагироваться еще 30 секунд. Затем, проводят центрифугирование (5 мин; 4000 оборотов/мин). Раствор пропускают через фильтр, покрытый 6 г сульфата натрия. Остаток смывают с фильтра еще 10 мл ацетонитрила. Объединенный фильтрат выпаривают и растворяют сперва 2 мл гексана, затем 3 мл ацетонитрила. Центрифугируют этот 2-фазный экстракт в течение 10 мин со скоростью 4000 оборотов/мин. Ацетонитрильную фазу дважды обезжиривают 2 мл гексана и выпаривают при 40°С досуха. Остаток растворяют 2 мл метанола; 1 мл этого экстракта окисляют. Окисление проводят Pbog (4 мг в 1,5 мл цитратного буфера); через 45 секунд, раствор (1 мл) просушивают потоком азота. Остаток растворяют 400 мкл растворителя А.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: LiChrosorb RP-8; 3 x 150 мм; размер частиц 5 микрон; требуется предварительная колонка с фазой С-3-8

Подвижная фаза: А: 1,92 г пентансульфокислоты в 70 мл фосфорной .кислоты; объем доводится ацетонитрилом до 1 л B: вода Градиент: 0 - 2 мин 60%В 2-6 мин от 60 до 0% В (линейное изменение) 6 -14 мин . *0%B*

Скорость протока: 0,8 мл/мин

Температура: 40°С

Вводимый объем: 20 мкл

Используемые для обнаружения длины волн; А: 590 нм В: 600 нм С: 266 нм (лейкобаза)

**Затруднения:** Для получения количественного экстрагирования, этапы экстракции приходится отрабатывать (по меньшей мере) дважды.

**Советы и праямущеотва**: Описанная подготовка образца является рутинным способом, используемым для анализа всех упомянутых веществ. Лейкобаза малахитового зеленого обнаруживается (после окисления) как сам малахитовый зеленый. Малахитовый зеленый можно обнаружить на уровне концентраций 1,8мкг/г. Допустимое предельное содержание: 10 мкг/кг. При таких концентрациях легко обеспечиваются идентификация и количественное определение (благодаря использованию указанного оборудования). Для получения информации *о* том, как различить малахитовый зеленый и его лейкобазу, см. публикацию 129.

**Литература для справок: 47,** 48, 129

### 3.3.2. Нитрофураны, никарбазнны

Применение нитрофуранов и никарбазинов в птицеводстве, основанном для получения яиц, запрещено. Известно, что большинство нитрофуранов. обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Соответствующий метод анализа этих соединений должен давать рысокую чувствительность; должен легко автоматизироваться (ради увеличения пропускной способности). Подобные вещества используются для борьбы с кокцидиозом (для сведения к минимуму риска заболевания цыплят). Остатки таких профилактических (лекарственных) средств могут обнаруживаться в съедобном мясе животных или в получаемом от животного природных продуктах (таких, как яйца или молоко). Поэтому, важна возможность контроля содержания подобных веществ.

**Вещества**: нитрофураны, никарбазины

**Подготовка образца**: После гомогенизации, образец смешивают с 40 мл ацетонитрила, подкисленного перхлорной кислотой. Через 1 минуту, добавляют 10 мл дихлорметана и позволяют образцу экстрагироваться еще 30 секунд. Затем, проводят центрифугирование (5 мин; 4000 оборотов/мин). Раствор пропускают через фильтр, покрытый б г. сульфата натрия. Остаток смывают с фильтра еще 10 мл ацетонитрила. Объединенный фильтрат выпаривают и растворяют сперва 2 мл гексана, затем 3 мл ацетонитрила. Центрифугируют этот 2-фазный экстракт в течение 10 мин со скоростью 4000 оборотов/мин. АЦетонитрильную фазу дважды обезжиривают 2 мл гексана и выпаривают при 40°С досуха. Остаток растворяют 2 нл метанола.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим снешивание 2 растворителей ), устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка; Hypersil-ODS; 100 x 2,1 мм, размер частиц 5 микрон (каталожный номер HP799160D-552)

Подвижная фаза: растворитель А: 0,02 М водный раствор ацетата, натрия; рН 5 (доводка уксусной кислотой) растворитель В: ацетонитрил Градиент: на 5-й мин 15%В на 10-й мин 40tB .: на 15-й мин 70%В на 17-й мин 90%В на 19-й мин 0%В

Скорость, протока: 0,5 мл/мин .

Температура: 50° С

Вводимый объем; 5 мкл

Используемая для обнаружения длина волны; А: 360 нм (ширина полосы 20 нм) В: 274 нм (ширина полосы 20нм)

**Затруднения**: Все операции, связанные с подготовкой образца, должны выполняться очень тщательно. Их следует повторять (по крайней мере) дважды. Загрязнение образца образцом при выполнении таких процедур может привести к затруднениям. Наиболее важный этап: обезжиривание.

**Советы и преимущества**: Вся процедура подготовки образца может быть заменена твердофазным экстрагированием на патроне Sep-Pak. Однако, в зависимости от матрицы, такое упрощение может привести к затруднениям анализа, выполняемого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Литература для справок**: **49,** 50, 51, 52

### 3.3.3. Сульфанидамидные препараты

#### 3.3.3.1. Сульфанидамидные препараты

Сульфаниламидные препараты применяются в животноводстве. Слежение за остаточным содержанием этих лекарственных средств производится органами надзора за качеством пищевых продуктов и государственными ветеринарными лабораториями. Поскольку соответствие установленным требованиям приходится проверять при наличии "коктейля" веществ, необходимы очень чувствительные и селективные методы анализа, дающие возможность прослеживать хотя бы 1 класс лекарственных средств (антибиотиков с подобным действием).

Газовая хроматография обеспечивает разрешающую способность, требуемую для разделения родственных аналогов антибиотиков. Однако, большинство веществ, используемых в качестве антибиотиков, не обладает летучестью, достаточной для прямого анализа методом газовой хромато-

графии. В тех ситуациях, когда высокая чувствительность электронозахватного детектора или термоионного детектора может быть выгодно использована, можно считать оправданными затраты времени на получение производных.

Вообще говоря, необходимость отработки дополнительных операций по получению производных недостаточно оправдана. Гораздо большее внимание привлекли методы, использующие жидкостную хроматографию. На сегодняшний день, считается целесообразным именного такой подход.

**Вещества**: Сульфатиазол (STZ), сульфадизаин (SDZ), сульфамеразин (SMZ), сульфадимидин (SDD), сульфаметоксипиридазин (5MPO),сульфамонометоксин (SMMX), сульфисозол (SIZ), сульфаме оксазол (SMX), сульфадиметоксин (3MOX),сульфхиноксалин (SQ)

**Подготовка образца:** Помехи обуславливаются (главным образом) рядом компонентов матрицы образца. В животных тканях содержится большое количество белков. Требуется довольно тщательная очистка для избавления от других мешающих веществ (таких, как жир и прочие другие липофильные вещества). Образцы экстрагируются этилацетатом; получаемый экстракт пропускается через патрон для твердофазного экстрагирования, заполненный аминофа-зой. Липофильные вещества удаляются из патрона несколькими промывками гексаном. Сульфаниламидные вещества элюируются смесью ацетонитрила с 0,2 М раствором фосфорной кислоты (24:76).

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором; масс-спектрометр.

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: с обращенной фазой; 150 х 4,0 мм; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: смесь ацетонитрил с водой (30:70)

Скорость протока: 0,65 мл/мин Вводимый объем: 5 мкл .

Используемая для обнаружения длина волны: 272 нм (ширина полосы 20 нм)

**Параметры, соответствующие настройке масс-спектрометра** и сбору данных: Напряжение на линзе, установленной на входе: 110 В Напряжение яа высокомощном диноде: 9000 В Напряжение на электронном умножителе: 2800 В Коэффициент усиления для атомных единиц массы: 146 Смещение атомных единиц массы: 155 Коэффициент усиления для масс = 69; смещение оси масс = 50 Дискрет = 0,1 атомн. ед. массы; режим: обычный сбор данных Период интегрирования = 100 мк\сек Число выборок данных = 2 (1)7 число усреднений =1; стандартный фильтр для масс. Временной фильтр =0,1 мин (под гауссовскую форму пиков)

**Затруднения**: Рассмотренный способ очистки способствует удалению и белков, и липофильных веществ. Было показано, что весь метод чувствителен, защищен от помех , гарантирует исключительно качественное извлечение исследуемых сульфаниламидных веществ.

**Советы и преимущества**: В научных публикациях описан упрощенный метод анализа остаточных количеств сульфаниламидных препаратов в молоке. Предложенный способ использует экстрагирование ацетонитрилом. Ацетонитрил осаждает большое количество молочного белка; осадок впоследствии удаляется центрифугированием.

Приставка Electrospray (дающая возможность состыковать жидкостный хроматограф с масс-спектрометром) допускает применение градиентного элюирования, улучшающего хроматографическое разделение. Масс-спектрометром обеспечивается и спектральная разрешающая способность. Изократическое разделение обеспечивается быстрее и не требует никакого регенерирования колонки.

**Литература для справок**: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 128, **161**

### 3.3.3.2. Сульфаниламидные препараты

Газовая хроматография обеспечивает разрешающую способность, требуемую для разделения родственных аналогов антибиотиков. Однако, большинство веществ, используемых в качестве антибиотиков, не обладает летучестью, достаточной для прямого анализа методом газовой хроматографии. В тех ситуациях, когда высокая чувствительность электронозахватного детектора или термоионного детектора может быть выгодно использована, можно считать оправданными затраты времени на получение производных.

**Вещества**: Сульфатиазол (STZ), сульфадизаин (SDZ), сульфамеразин (SMZ), сульфадимидин (SOD), сульфаметоксипиридазин (SMPD), сульфамонометоксин (SKMX), сульфисозол (SIZ), сульфаметоксазол (SMX), сульфадиметоксин (SMDX), сульфхиноксалин (SQ)
параметры, соответствующие работе прибора: Колонка: кварцевая капиллярная; SE54; длина 25 м Толщина пленки фазы: 0,5 Микрона Температура колонки: 160 С в течение 1 минуты затем, изменение со скоростью 20°С/мин до ЗОО С Температура устройства для введения образца: 250°С Способ введения образца: без деления потока. Вводимый объем: 2 мкл

**Прибор**: газовый хроматограф, оснащенный масс-селективным детектором

**Советы и преимущества**: Параметры, соответствующие работе масс-селективного детектора, приведены в публикации 161.

**Литература для справок**: 53, 54, 128, 161

### 3.3.4. Хлорамфеникол

**Вещества:** Хлорамфеникол, сульфатиазол (ST2), сульфадизаин (SDZ), сульфамеразин (SMZ), сульфадимидин (SDD), сульфаметоксипиридазин (SMPD), сульфамонометоксин (SMMX), сульфисозол (SIZ), сульфаметоксазол (SMX), сульфадиметоксин (SMDX), сульфхиноксалин (SQ), фуразолидон

**Подготовка образца**: В случае менее сложных матриц образца, можно воспользоваться одним простым этапом экстрагирования (вместо трудоемкой очистки, которая была описана для подготовки к анализу сульфаниламидных препаратов). Однако, для получения надежных результатов, настоятельно рекомендуется пользоваться подходом, указанным для подготовки к анализу сульфаниламидных препаратов.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**

Колонка; Hypersil-ODS; 100 х 2,1 мм; 5 микрон (каталожный номер НР799160D-552)
Подвижная фаза: 0,02 М раствор NaAc; pH доводится до 5 уксусной кислотой
Скорость протока: 0,5 мл/мин
Градиент: на 5-й мин 15%В . на 10-й мин 40%В на 12-й мин , 20%В
на 17-й мин 0%В.
Температура: 50°С Вводимый объем: 5 мкл
Используемая для обнаружения длина волны: 274 нм (ширина полосы 20 нм)

**Затруднения:** Помехи обуславливаются (главным образом) рядом компонентов матрицы образца. В частности, присутствие жира и белков могут привести к серьезным осложнениям (мешающим получить качественное разделение).

**Советы и преимущества**: Имеется и сводка параметров, соответствующих обнаружению с помощью масс-спектрометра. Для ознакомления с этой информацией, см. публикацию 53.
Литература для справок: 53,54,128

### 3.3.5. Препараты пенициллинового ряда

Органы, следящие за качеством пищевых продуктов, пользуются очень неселективным способом проверки содержания остаточных количеств антибиотиков в мясе: кусочек мяса помещается на пластинку, используемую для выращивания культур. Если рядом с кусочком мяса культуральные клетки не растут, это указывает на назначение животному антибиотиков (перед забоем).

**Вещества**: Пенициллин, ампициллин (IOR), карбенициллин (IOS), карбенициллин, (10К)-тикарциллин, (105)-тикарциллин, пенициллин G

**Подготовка образца;** Пригодная для молока процедура основана на использовании ацетонитрила для экстрагирования из образца. Ацетонитрил осаждает большую часть молочного белка; осажденный белок впоследствии удаляется центрифугированием. Кроме того, первоначальный ферментативный гидролиз образца молока может улучшить защиту от потенциально мешающих

веществ благодаря образованию пенициллоата из в-лактамной части молекулы соответствующего соединения пенициллинового ряда. Впоследствии, с помощью хлористой ртути (11), образуются конечные альдегиды; пенициллоалдегид экстрагируется хлористым метиленом.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, спектрофотометрический детектор (с изменяемой длиной волны)

Соответствующие методу параметром:

Колонка: Hypersil ODS-C18; разнер частиц 3 микрона; 100 x 4 мм •

Подвижная фаза: растворитель А; ацетонитрил растворитель В: вода, доведенная до pH 2,1 уксусной кислотой

Градиент: исходно, й5%В за 10 минут до 40%В

Скорость протока; 0,5 нл/мин Температура: 25°C

Вводимый объем: 10 мкл

Используемая для обнаружения длина волны: 355 нм (ширина полосы 20 нм)

**Советы и преимущества**: Разделение в жидкостном хроматографе при низком pH (2) дает узкий пик пенициллина G (безо всяких помех). Этот подход помогает обнаружению и других аналогов пенициллина. Однако, из различия функциональных групп, приходится подбирать оптимальные условия хроматографического анализа каждого из аналогов.

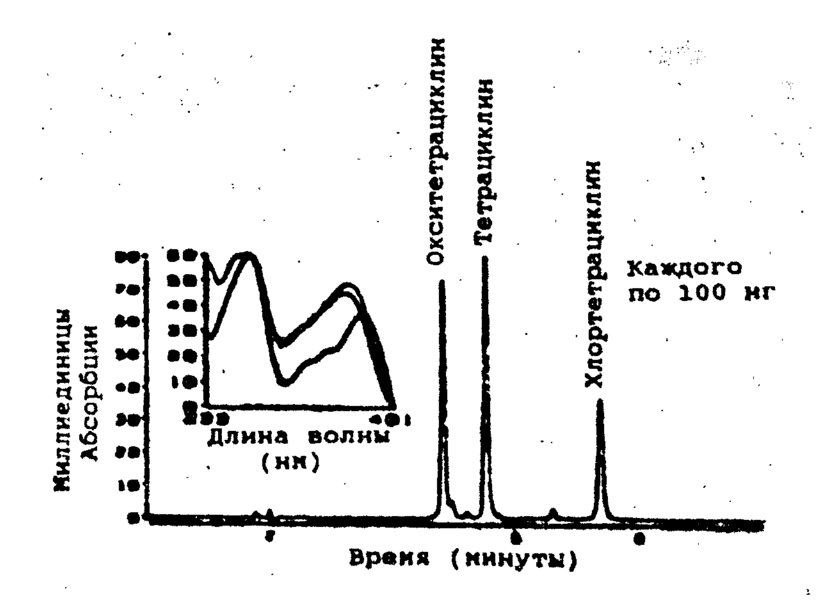
Литература для справок: 128

### 3.3.6. Тетрациклины, циклоспорины

**Вещества**: Окситетрациклин, тетрациклин, хлортетрациклин

**Подготовка образца**: 10 г гомогенизированного образца смешивают с 93 г сукцинатного буфера (публикация 130); гомогенизируют и центрифугируют в течение 15 минут при 5000 оборотов/мин. Раствор фильтруют и измеряют полученный объем. Фильтрат пропускают через колонку с Сефарозой. Колонку трижды промывают 10 мл воды, 30 мл метанола, после чего промывают снова дважды 10 мл воды. Элюирование производится 40 мл буфера. После этого, опять промывают 10 мл буфера. Скорость протока жидкости через колонку снижают (примерно) до 4 мл/мин. Проводят очистку на патроне Sep-Pak для твердофазного экстрагирования (заполненной материалом с обращенной фазой). Элюируют 6 мл щавелевой кислоты в метаноле. Добавляют 1 мл метанола, в который добавлены этиленгликоль и 2-меркаптопропионовая кислота. метанол выпаривают при 37°C. Остаток доводят фосфорной кислотой до 0,5 нл. Получаемый раствор анализируете помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), .устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей




**Соответствующие методу параметры** Колонка: Hypersil BDS-C18;100 x 4 мм; размер частиц 3 микрона

Подвижная фаза: растворитель А: вода; pH 2,1 (доводка любой подходящей кислотой; например, фосфорной) растворитель В: ацетонитрил

Градиент: О мин 15%В 8 мин 6О%В

Скорость протока: 0,5 мл/мин Температура: 25°C

Вводимый объем: зависит от концентрации и матрицы образца

Используемая для обнаружения длина волны: 355 нм (ширина полосы 20 нм).

**Затруднения**: Очистку образца следует производить очень тщательно.

**Советы и преимущества**: Преимуществом такого метода является широкий диапазон классов веществ, которые можно анализировать за одну разгонку.

**Литература для справок: 56**

## 4. Специальные методы, применимые к конкретным пищевым продуктам

В этом разделе описываются вертикальные указания (см. пояснения на стр. II). Рассматриваемые методы применимы для анализа специфичных пищевых продуктов (например, таких, как молоко или мясо). Некоторые подходы к контролю одних и тех же веществ будут описаны несколько раз (для разных продуктов). На все методы, рассмотренные в предыдущих разделах, даются ссылки (адресующие к методу). В каждом подразделе даются описаниям приводятся пояснения, почему предлагаемый метод важен.

### 4.1. Молоко и молочные продукты

Молоко различается по - происхождению (коровье, овечье ...)

- виду пастеризации (нагревом или другая обработка, дающая те же самые эффекты)
- содержанию жира (цельное [около 3,5% жирности]; полужирное [жирность не менее 1,5% и не более 1,8%]; обезжиренное [менее 0,3% жира ] ) :

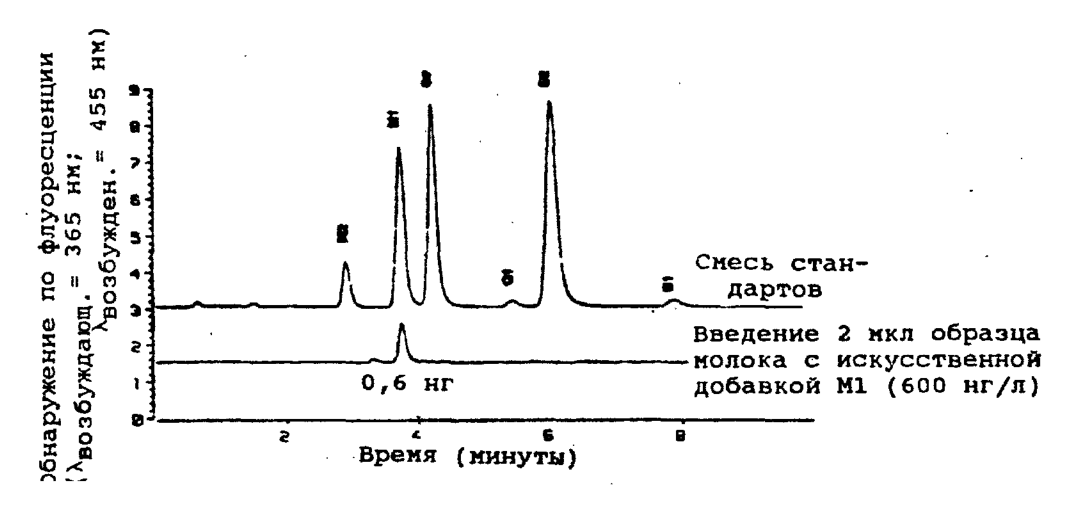
Все виды молока должны отвечать соответствующим законодательным требованиям и запросам потребителя. Для контроля качества молока необходимы различные анализы. Описанные здесь варианты анализов могут быть реализованы (с использованием современного оборудования) быстро и надежно.

Число веществ, контролируемых в молочных продуктах, дополнено теми, которые могут быть искусственно добавлены (из-за чего приходится проверять соответствие этикетке). Если на этикетке не сообщено о таких добавках, это считается обманом.

#### 4.1.1. Афлатоксины

Следят за содержанием афлатоксина M1. Это вещество является метаболитом афлатоксина B1 и наиболее часто обнаруживается зимой (когда животному дается корм из зерновых культур и кукурузы, хранимых во влажных условиях). В Европе допустимы крайне низкие содержания в молоке для кормления грудных детей или в детском питании, содержащем молоко. Для такого анализа требуются высокая чувствительность и селективность. Диализ описан в подразделе 3.2.2 («Афлатоксины»).

Содержание афлатоксинов в молоке




#### 4.1.2. Консерванты

Никаких консервантов в молоке не должно быть. Пользование консервантами в молочных продуктах разрешено, но о наличии таких веществ должно иметься предупреждение на этикете. По-

скольку потребитель может предпочитать покупать продукты, в которых нет консервантов, приходится проверять соответствие этикетке (если на ней указывалось отсутствие консервантов, проверяют наличие этих веществ. Метод анализа описан в подразделе 3.1.1.

### 4.1.3. Красители

Красители иногда используются для создания впечатления повышенной жирности. Метод анализа красителей описан в подразделе 3.1.4.

### 4.1.4. Противоокислители

Противоокислители добавляются по тем же причинам, что и консерванты. Об их наличии должна предупреждать этикетка. В частности, при все возрастающей популярности "на lOO% природные" продукты, потребитель предполагает, что такие продукты обрабатываются без пользования синтетическими веществами.

### 4.1.5 Анионы

На содержание фосфатов, сульфатов, хлора, йода в некоторых молочных продуктах (например, в сливочном масле) наложены специфичные ограничения. Эти ионы могут быть быстро, легко и надежно определены с помощью стандартного высокоэффективного жидкостного хроматографа (для чего пользуются набором "для диализа анионов") или с помощью системы для капиллярного электрофореза, предлагаемой фирмой "Хыолетт-Паккард".

### 4.1.6. Ферментативная активность

В сыром молоке приходится контролировать ферментативную активность. Молоко не должно нагреваться, благодаря чему может быть проверена полная ферментативная активность (проводится реакция с ферментом, продуктом которой является вещество, обнаруживаемое с помощью спектрофотометра).

### 4.1.7. Органические кислоты

Молочные продукты могут распознаваться по оротовой кислоте (характерному компоненту молока и молочных продуктов), содержание которой легко анализируется методом, описанным в подразделе 3.1.5 (этот метод пригоден для всех органических кислот). Проверка такого содержания способна выявить подмену, В подразделе "Пищевые добавки" (подраздел 3.1) описаны несколько способов анализа органических кислот (с помощью капиллярного электрофореза или высокоэффективной жидкостной хроматографии).

### 4.1.8. Сахара

#### 4.1.8.1. Сахара и углеводы

В последнее время были разработаны подходу к анализу углеводов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, являющейся мощным разделительным методом. Иногда, в целях контроля качества продукции, может исследоваться содержание лактозы и Сахаров.

**Вещества:** Глюкоза, фруктоза, сахароза, арабиноза, нальтоза, глицерин

**Подготовка образца:** Требования к подготовке образца зависят от сложности матрицы. В большинстве случаев, достаточно лроэкстрагировать образец водой. Нерастворимые частицы можно удалить фильтрацией. В случае образцов с высоким содержанием жира, необходим этап очистки петролейным эфиром. Белки должны быть устранены методом осветления, описанным Carrez.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, термостатом для колонки, электрохимическим детектором

**Соответствующие нетоду параметры:** Колонка; с катионообменной смолой, HPX-87A (фирма Bio-Rad Laboratories); размер частиц 10 микрон; 300 х 7,8 мм

Подвижная фаза: 0,01 н. $H_2SO_4$ Температура: 40°C Вводимый объем:. 10 мкл

Обнаружение; электрохимический детектором Режим; импульсная амперметрия

Электрод: золотой потенциал: 0,22В

**Затруднения**: Необходимо проверять качество растворителей, используемых согласно методу, предложенному Carrez (поскольку плохое качество растворителей может приводить к снижению степени извлечения интересующих веществ и к помехам обнаружению). Образование рацематов и изомеров приводит к регистрации более широких пиков.

**Советы и преимущества:** В случае нестабильных Сахаров, пользоваться неподвижными фазами в щелочной форме нельзя из-за возможных побочных эффектов (особенно при повышенных температурах). Разделение ножно производить на колонке Hamilton RCX-10 (254 х 4,1 мм; 10 микрон) или на колонке Dionex Polyspher CH PB (300 х 7,9 мм); в качестве подвижной фазы применяется 0,1 М раствор NaOH, pH 13; скорость протока 1 мл/мин; вводимый объем образца может составлять тоже 3 мкл. Электрохимическое обнаружение дает возможность обнаруживать очень малые концентрации (для обнаружения более высоких количеств можно пользоваться рефрактометрическим детектором). Ферменты могут снижать степень извлечения, которую приходится проверять перед каждым одиночным анализом. При наличии таких ферментов, приходится ограничиваться анализом только одного специфичного сахарида.

**Литература для справок**: 89, 7, 98, 130

### 4.1.8.2. Сахара и углеводы

Природные полисахариды (такие как крахмал или пектин) могут использоваться в молочных продуктах для улучшения консистенции и для создания впечатления о более высоком содержании сливок. Такими веществами может быть замаскировано разбавление водой. Существуют некоторые национальные стандарты, предусматривающие пользование газовым хроматографом (с пламенно-ионизационным детектором). Лаборатории, проверяющие качество пищевых продуктов, обязаны пользоваться этим способом анализа. Подготовка образца является довольно трудоемкой. Разделение с помощью газового хроматографа обеспечивается с использованием указанных далее параметров.

**Вещества**: Глюкоза, фруктоза, сахароза, арабиноза, мальтоза, мальтотриоз, моносахариды, дисахариды, трисахариды

**Подготовка образца:** Образец должен быть полностью высушен. Для получения летучих соединений, необходимо получение производных до введения в хроматограф. Можно пользоваться силилированием или ацилированием.

**Прибор**: газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором.

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: кварцевая капиллярная; длина 30 н; внутренний диаметр 0,32 мм; силоксановаяфаэа SE-52 Температура колонки; исходно 120°C; изменение со. скоростью 4°С/мин до 220^С Температура устройства для введения образца: 250°C Температура голойки детектора; 250^С Газ-носитель: азот; 1,5 мл/мин

Коэффициент деления потока: 1:15 Вводимый объем: 1-2 мкл

**Хроматограмма:** показана в публикации 59

**Затруднения:** Получение производных должно производиться при полном отсутствии влаги. Наличие какого-то количества воды может привести к осложнениям процесса получения производных.

**Советы и преимущества:** Лаборатории, занимающиеся контролен пищевых продуктов, должны пользоваться методом газовой хроматографии для предоставления официальных заключений. Однако, часто используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (который сокращает продолжительность анализам дает обзорный результат). Если с помощью жидкостного хроматографа обнаружено недозволенное содержание веществ, приходится воспользоваться газовой хроматографией для получения официально действующего заключения.

Ферментативная реакция, проводимая после разделения на колонке, описана в публикации 157.

**Литература для справок**: 59, 157

### 4.1.9. Углеводы

Углеводы не содержат хромофорных групп и не обладают способностью к флуоресценции, что исключает обнаружение спектрофотометрическим или рефрактометрическим детекторами. Большинство таких веществ способно поглощать свет в коротковолновой части ультрафиолетовой области спектра (но на этих длинах волн обычно обнаруживаются сильномешающие другие компоненты образца). Степень очистки образцов и растворителей затрудняет регистрацию на длинах воли ниже 200 нм; такой подход оказывается усложненным и дорогостоящим. На сегодняшний день, рефрактометрический детектором при анализе углеводов пользуются наиболее часто. Для получения более высокой чувствительности можно использовать электрохимический детектор. Но для пользования таким подходом нужно обладать фундаментальными знаниями свойств образца при таких условиях обнаружения (при высоких pH).

**Вещества:** Фруктоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, галактоза.

**Подготовка образца**: Необходима тщательная подготовка. Одним из подходов является лиофилизирование. Напитки, из которых удален газ, можно вводить в хроматограф непосредственно (после фильтрации). Более сложные образцы требуют более сложной обработки (такой, как удаление белкови жира). Очистка образца для устранения менее полярных примесей обеспечивается методом твердофазного экстрагирования на патронах Sep-Pak с фазой C-18. Для избежания порчи аналитической колонки и жидкостного хроматографа, обычно пользуются предварительными колонками, заполненными тем же материалом, что и аналитические.

**Прибор;** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, рефрактометрический детектором

**Хроматограмма:** приведена в публикации 98

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Силикагель с химически привитой аминофазой (Aminex HPX-87P)

Подвижная фаза: вода Скорость протока: 0,6 мл/мин Температура: 85°.C

Обнаружение: с помощью рефрактометрического детектора

**Затруднения:** Образование оснований Шиффа при взаимодействии аминогрупп и восстановленных Сахаров может приводить к потерям (в частности, при повышенных температурах ). Кроме того, такая в такой реакции могут участвовать неподвижная фаза (аминогруппы) и восстановленные сахара. Это приводит к сокращенно срока службы колонок (из-за таких и некоторых побочных эффектов).

**Советы и преимущества**: Употребление предварительных колонок может приводить к размыванию зон и к небольшим изменениям времен удерживания.

Влияние подготовки образца на степень извлечения должно проверяться путем аналогичной обработки смесей стандартов. Только таким образом удается определить, удерживаются ли какие-то вещества матрицей образца и не модифицируются ли (не портятся) при пользовании выбранным способом.

Литература для справок: 98, 131

### 4.1.10. Молочный белок

Молочного белка в пахте не должно быть. Существуют различные способы анализа этого белка методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза. Подготовка образца к исследованию методом капиллярного электрофореза сводится к простому экстрагированию. Анализ может производиться *с* использованием описанных далее параметров.

**Вещества**; молочные белки

**Подготовка образца**: Молоко разбавляется буферным раствором (1:10). Молочные продукты должны быть предварительно гомогенизированы и профильтрованы.

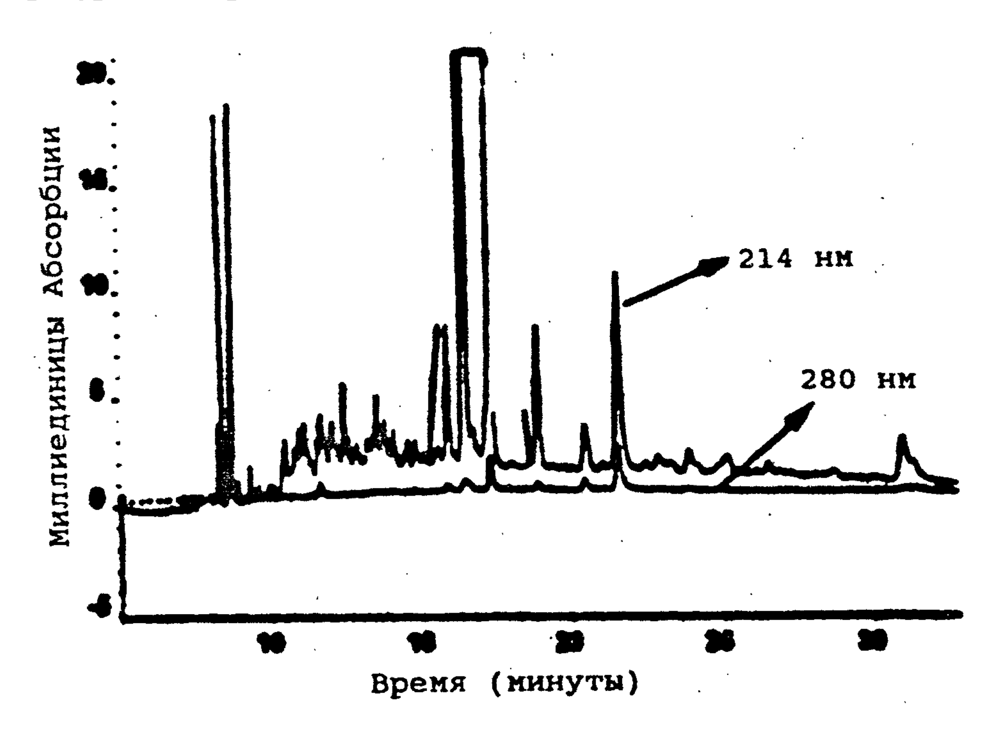
**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза

**Соответствующие методу параметры:** Капилляр: кварцевый; длина 48 сн; внутренний диаметр 50 микрон . Буферный раствор: 10 мМ цитрат натрия, pH 2,57 6 М моче-

вина Напряжение: 3ОкВ, 74 мкА Температура: 45^С ' Введение: 500 мбарсек Используемые для обнаружения длины волн: А: 280 нм (ширина полосы 26 нм) В: 214 нм (ширина полосы 16 нм)

**Советы и преимущества**: Этот способ разделения дает быстрые, эффективные идентификацию и количественный анализ. Не требуется сложной подготовки образца. Воспроизводимость времени миграции (показанного наэлектрофореграмме) исключительно высокая. После соответствующей подготовки образца, этот метод может использоваться и для анализа любых других пищевых продуктов (однако, крайне важной оказывается правильность подготовки образцов; могут потребоваться дополнительные этапы очистки).

**Литература для справок:** 60, 61, **62, 95**




## 4.1.11. Триацилглицериды

Анализ триацилглицеридов необходим для подтверждения фальсификации, сводившейся к подмене другими жирами. Определение может обеспечиваться как методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, так и с помощью газовой хроматографии. Тот и другой подходы допускают полной автоматизацией получение высокой пропускной способности. Содержание триацилглицеридов может быть сопоставлено с указанным в специальных публикациях (в таких публикациях часто приводятся полные перечни, поясняющие триацилглицеридный состав).

Вещества: Моноглицериды, диглицериды, триацилглицериды, ситостерин, сигмастерин, холестерин, токоферол

**Подготовка образца**: Триацилгицериды могут вводиться в хроматограф непосредственно (при высоких температурах).

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

Соответствующие истоду параметры: Колонка: SE-30 (3%) на хромосорбе GAW-DCMS; 100-120 меш; 0,5 м х 2 мм; кварцевая . Температура колонки: от 200 до 36О^С; 2°С/мин Температура устройства для введения образца: 36О^С Температура головки детектора: 380°С Газноситель; азот; 30-50 мл/сек Коэффициент деления потока: .1/50 - 1/100 Вводимый объем; 0,5-1 мкл

**Хронатограмма:** приведена в публикации 7

**Затруднения:** Порядок выхода триацилглицеридов из колонки (и разделение) зависит от числа атомов углерода. Разделить компоненты различных жиров и масел, характеризующиеся тем же самым числом атомов углерода, очень сложно. Пики трипальмитина (16/16/16) и миристопальмито-стеарина (14/16/18) сливаются.

**Советы и преимущества**: Различная летучесть этих жировых компонентов дает возможность разделения при запрограммированном изменении температуры колонки. Разработан метод разделения моноглицеридов, диглицеридов и триглицеридов в жидкостном хроматографе (на колонке с ионами серебра; такие неподвижные фазы обеспечивают разделение по числу двойных связей в эфирах жирных кислот, а не по длине углеродной цепи).
Литература для справок: 7, 63, 64, 143

## 4.1.12. Жир, жирные кислоты

### 4.1.12. 1. Жир, жирные кислоты

Масло отличается от маргарина относительными концентрациями жирных кислот (от С-4доС-24) в жире. Масло опознается по специальному проценту масляной кислоты в триацилглицеридах.

**Вещества**: Жирные кислоты (с С-4 по С-24); эфиры пропионовой, уксусной, масляной, валериановой, капроновой, лауриновой, энтановой, тетрадекановой, гексадекановой, октадекановой, эйкозановой кислот

**Подготовка образца;** Триацилглицериды гидролизуются о горячей смеси метанола с КОН. Обнаружение жирных кислот может быть облегчено получением производных непосредственно на колонке. Используемый для этого реактив (бромфенацилбромид + 18-краун-б эфир) и образец вводятся в шприц с соблюдением специальной последовательности. Для предотвращения гидролиза, сперва в шприц вводят неганод; затем - реактив; затем - образец, содер-
жирные кислоты; затем - другая часть реактива и, наконец, жащийметанол. Эта смесь вводится в колонку.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны)
**Хроматограмна:** приведена в публикации 71

**Соответствующие методу параметры:**
Колонка: Hypersil ODS; 100 мм х 2,1 мм (каталожный номер HP79911GP-501)
Подвижная фаза: растворитель А: вода растворитель В: ацетонитрил
Градиент: на 5-й мин 30%В, на 15-й мин 70%В на 17-й мин 80%В на 25-й мин 100%В Скорость протока: 0,45 мл/мин
Вводимый объем: реактив: образец: реактив 4:1:4 мкл
Используемая для обнаружения длина волны: 258 нм

**Затруднения**: Необходимо доказать, что гидролиз дает количественно точные результаты.

**Советы и преимущества:** Количественный анализ содержания масляной кислоты позволяет подсчитать процент молочного (масляного) жира в триацилглицеридах. С помощью такого метода легко может быть отмечена фальсификация масла. Классическим способом предусматривается гидролиз триацилглицеридов после экстрагирования петролейным эфиром. Гидролизат подвергается перегонке (лишь после которой можно количественно определить содержание масляной кислоты). Все эти операции очень трудоемки и весьма чувствительны к любым допущенным при процессе ошибкам. Описанный метод может использоваться для поисковых проверок; может быть автоматизирован. Во время процесса перегонки могут отмечаться некоторые потери анализируемого вещества. На стр. 110 дается описание альтернативного подхода к анализу жирных кислот
**Литература для справок: 71**

### 4.1.12.2. Метиловые эфиры жирных кислот

Определение содержания жира требуется для того, чтобы полужирное молоко не могли продавать, как цельное. Идентификация и количественная оценка содержания жирных кислот в мицеллах жира дает возможность определить происхождение молока (от какого оно животного) или распознать смесь молока, полученного от разных животных (дешевое коровье молоко может использоваться для фальсифицирования более дорого овечьего). Анализ может производиться методом газовой хроматографии после превращения жирных кислот в их метиловые эфиры, растворения жиров в эфире и добавления гидроокиси тетраметиламмония. После добавления воды и раз-

деления фаз, фаза эфира подвергается анализу в газовом хроматографе. Идентификация этого класса веществ необходима и при анализе шоколада. Процентное содержание жира какао - важный параметр, характеризующий качество шоколада. Жир кокосового ореха может использоваться для подмены большого количества жира какао в шоколаде. Специфичные жирные кислоты обнаруживаются только в жире какао, но не в жире кокосового ореха. По этой причине приходится контролировать жирнолислотный состав шоколада.

**Вещества**: Этилпропионат, пропилацетат, этилбутират, пропил-пропионат, пропилбутират, этилвалерат, бутилпропионат, пропилвалерат, этилкапроат, бутилвалерат, пропилкапроат,итилдеканоат, бутилкапроат, метилдодеканоат, бутилгептаноат, метилтетрадеканоат, метилгекасноат, метилоктандеканоат, метилэйкозеноат; цис-9-гексадеценовая (цис-пальмитолеиновая) кислота; транс-9-гексадеценовая (транс-пальнтолеиновая) кислота; октадекановая (стеариновая) кислота; цис-9-октадеценовая (олеиновая) кислота; транс-9-октадеценовая (элаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-окта-декандиеновая (линолевая) кислота; транс-9-транс-12-октадекади-еновая (линолелаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-цис-15-октаде-катриеновая (линоленовая) кислота

**Подготовка образца**: 0,5 г жира или масла нагреваются вместе с 4,5 мл метанола и метилатом натрия в течение 1 часа в сосуде с обратным холодильником. После охлаждения до комнатной температуры, добавьте 1 ионообменника в кислотной форме и тщательно перемешивайте в течение 1 минуты. После такой обработки, супернатант должен оказываться нейтральным. Этот супернатант используется для анализа.

**Прибор**: газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором .

**Соответствующие методу параметры:** Колонка; HP INNOWAX (химически привитой PEG) Температура колонки: 45 С. Температура устройства для введения образца: 220°С Температура головки детектора: 250°С Газ-носитель: гелий; 30 сн/сек; режим обеспечения постоянной скорости протока 4 мл/мин (за счет системы с электронным регулированием давления) Коэффициент деления потока: 25:1 Вводимый объем: 0,2-1 нкл

**Хронатограмма:** приведена в публикации 129

**Затруднения:** Растворы реактивов, используемые при подготовке образца, не должны содержать воду. Во время нагрева, вода не должна контактировать с анализируемыми веществами

Советы и преимущества: В конкретных образцах, трудно идентифицировать смеси жиров и масел, характеризующиеся похожим жирнокислотным составом. В этих случаях, может оказаться полезным высокотемпературный анализ исходных триглицеридов. По метиловому эфиру масляной кислоты можно опознавать молочный жир.

**Литература для справок:** 7,57,129

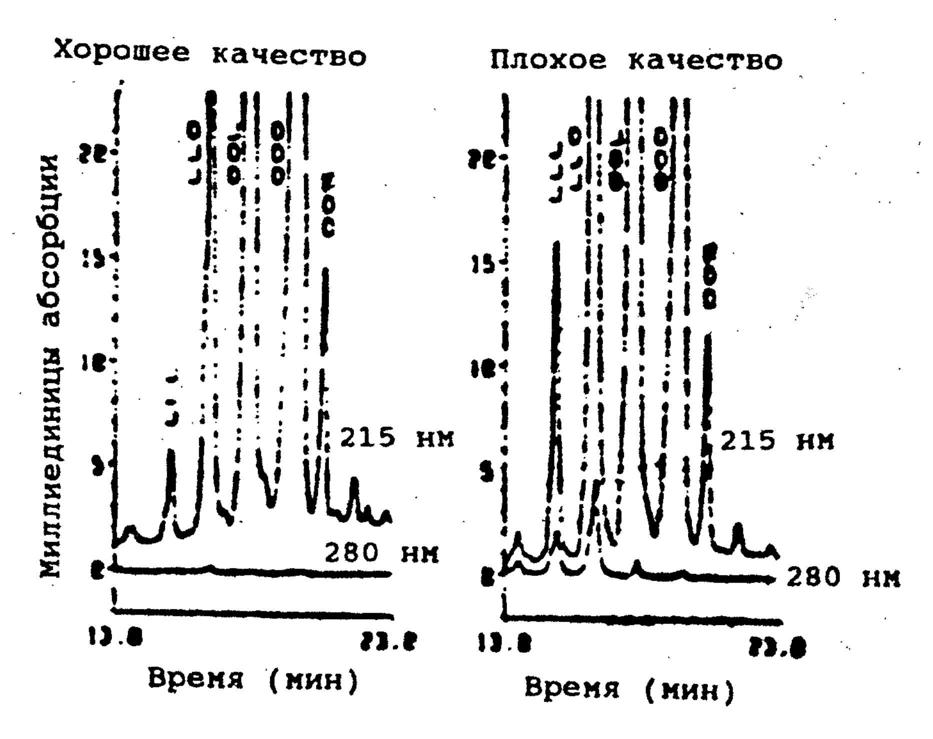
### 4.1.1.3. Многокомпонентный анализ жиров и масел

Разделение триацилглицеридов в течение довольно длительного периода представляло собой сложную задачу для многих специалистов. Несколько лет эту задачи решали методом газовой хроматографии. Однако, такой подход не дает достаточно информации о полном триацилглицеридном составе. Подобный вид анализа весьма необходим при производстве природных масел (в целях контроля качества процесса рафинации). Спектральные характеристики подвергшихся рафинации триацилглицеридов изменяются (за счет изменения сопряжения двойных связей). Ценную информацию предоставляет снятие спектрограмм в ходе хроматографической разгонки.

**Вещества:** Триацилглицериды, ситостерин, сигмастерин, холестерин, токоферол.гидропероксиды

**Подготовка образца:** Экстрагирование триацилглицеридов из гомогенизированного образца петролейным эфиром.

Прибор: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, детектором с диодной матрицей




**Соответствующие методу параметры:** Колонка: MOS-HyperBil; 200 х2,1 мм; размер частиц 5 никрон Подвижная фаза: Растворитель А: вода Растворитель В: смесь ацотонитрила с метилтретбутилоным эфиром (9:1)
Градиент: на 0-й мин 87%В на 25-й мин 100%В Скорость протока: 0,8 мл/мин; Температура: 6О°С Используемые для обнаружения длины волн: А: 215 нм В: 240 нм С: 280 нм D: 400 нм

**Советы и преимущества**: Пользуясь описанным методом, можно разделять и обнаруживать токоферолы,холестерин, сигмастерин и ситостерин. Употребление метил-трет .бутилового эфира вместо тетрагидрофурана (обычно используемого) дает возможность работать с детектором с диодной матрицей (позволяющим получать больше информации о веществах и контролировать чистоту пиков).
**Литература для справок**: 70

### 4.1.14. Молочный жир

Характеристичным для молочного жира веществом является масляная кислота (один из жирных кислот, входящих в состав триа-цилглицеридов). После получения производных (метиловых эфиров компонентов триацилглицеридов), можно обнаруживать фальсификацию молока и молочных продуктов (таких, как масло).

**Вещества**: Жирные кислоты (С3-С22); эфиры пропионовой, уксусной, масляной, валериановой, капроновой, лауриновой, энтаковой, октановой, пеларгоновой, декановой, ундекановой, додекановой, тетрадеценовой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, арахидоновой, эйкозеновой, бегеновой, эруковой, нервоновой кислот

**Подготовка образца:** 0,5 г жира или масла нагреваются вместе с 4,5 мл метанола и метилатон натрия в течение 1 часа в сосуде с обратным холодильником. После охлаждения до комнатной температуры, добавьте 1 ионообменника в кислотной форме и тщательно перемешивайте в течение 1 минуты. После такой обработки, супер-натант должен оказываться нейтральным. Этот супернатант используется для анализа.

**Прибор:** газовый хроматограф, оснащенный пламенноионизационным детектором

Соответствующие методу параметры: Колонка: HP INNOWAX (химически привитой PEG); 30 их 0,32 мм; толщина пленки фазы 0,5 микрона; номер по каталогу фирны "Хьюлетт-Паккард": 19091N-213 Температура колонки: 50°С Температура устройства для введения образца: 220 °С Температура головки детектора; 275°С Газ-носитель: гелий; 40 см/сек; 11,8 фунтов на кв. дюйм; режим обеспечения постоянной скорости протока 2,6 мл/мин (за счет использования системы электронного, регулирования давления) Коэффициент деления потока; 100 il Вводимый объем: 0,5 мкл Внутренний стандарт: эфир валериановой кислоты

**Затруднения:** Растворы реактивов, используемые при подготовке образца, не должны содержать воду. Во время нагрева, вода не должна контактировать с анализируемыми веществами

**Советы и преимущества**; В конкретных образцах, трудно идентифицировать смеси жиров и масел, характеризующиеся похожим жирнокислотным составом. В этих случаях, может оказаться

полезным высокотемпературный анализ исходных триглицеридов. По метиловому эфиру масляной кислоты можно опознавать молочный жир.

**Литература для справок**: 7, 57, **129**

## 4.2. Мясо и мясные продукты

Мясо содержит белок, характеризующийся высокой питательной ценностью (в частности из-за наличия так называемых незаменимых аминокислот, которые.не могут вырабатываться в организме человека и, поэтому, должны поступать через продукты питания). Суточная потребность, удовлетворяемая с помощью мяса; 40% белка, 27% жира, 18% К, 3% Са, 26% Р, 30% Fe, 36% витамина А, 50% ти-амина, 32% рибофлавина и 61% ниацина. В мясе содержатся: белок (18-22%), жир (6-21%), вода (56-75%) и неорганические вещества (около 1%). Такой состав типичен для мышечной ткани, жировой ткани и соединительной ткани.,

Процентное содержание белка может определяться по методу Кьельдаля, основанному на анализе процентного содержания азота во всем образце. Типичное для мяса значение будет пропорциональным содержанию мяса во всем исследуемом продукте. Результаты такой проверки могут быть легко подделаны за счет добавления веществ с высоким содержанием азота (например, мочевины, растительных белков, более дешевого куриного мяса, молочного белка, хлопкового белка или искусственным путем полученных белков). Такие белковые добавки должны быть опознаны, чтобы уличить в обмане. Кроме того, другие пищевые добавки (такие, как эмульгаторы и жир) могут быть добавлены в продукты (ради увеличения веса за счет воды) в таких продуктах, как колбасы (это дает возможность сэкономить на мясе). Существуют специальные указания и областные законодательные требования, регламентирующие состав таких мясных продуктов. Приводимые ниже подразделы поясняют способы обнаружения обмана.

### 4.2.1. Соевый белок

Соевый белок может использоваться для фальсификации мяса. За счет добавления соевого белка имитируется более высокое содержание белка в мясе. Этот вид обработки запрещен для всех пищевых продуктов, если не имеется достаточно четкого уведомления о такой добавке на этикетке. Употребление в некоторых видах продуктов полностью запрещено. Рассмотренный вариант анализа успешно используется для контроля качества при производстве соевого соуса.

**Вещество:** соевый белок

**Подготовка образца:** Соевый соус может вводиться в хроматограф непосредственно (после разбавления буферным раствором в соотношении 1:10). Из мясных продуктов белок приходится экстрагировать. Возможно экстрагирование 10 мл буферного раствора из 2-3 г мяса. Гомогенизированную смесь помещают на 10 минут в ультразвуковую баню. Затем, производится экстрагирование из смеси в течение 2 часов при 38^С.

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза электрофореграмна:

**Соответствующие методу параметры:** Капилляр: длина = 64,5 сн; эффективная длина 56 см; внут ренний диаметр 50 микрон Буфер: 50 мМ фосфатный буферу рН 2 Напряжение: 30 кВ Температура: 20°С Введение: 450нбарсек Используемые для обнаружения длины волн: А: 200 нм (ширина полосы 10 им); контрольная длин 450 нм (ширина полосы 80 им) В: 280 нн (ширина полосы 10 ни); контрольная длин 450 нн (ширина полосы 80 нм)
волны волны

**Советы и преимущества**: Жидкие образцы могут вводиться непосредственно, после разбавления до нужной концентрации. Воспроизводимость очень высокая. Одновременное обнаружение на 2 длинах волн предоставляет больше информации о структуре белков в пептидной карте.

### 4.2.2. Анионы

#### 4.2.2.1. АНИОНЫ

$NO_2$ и $NO_3$ используются в копченых мясных продуктах для сохранения возбуждающей аппетит розоватости. Эти вещества действуют в качестве противоокислителей и улучшает запах. Содер-

жание токсичного NO, ограничено законодательными требованиями (как и содержание нитратов, которые могут быть преобразованы в NO, за счет метаболического превращения микроорганизмами, имеющимися в рту. Фосфаты используются при производстве колбас для улучшения способности белков к связыванию с водой. Для этих целей (в ограниченных количествах) разрешен только дифосфат. По этой причине, имеется необходимость идентификации и количественной оценки содержания всех возможных фосфатов, присутствующих в колбасах и других мясных продуктах. Анализ может быть выполнен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с косвенным обнаружением по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра после экстрагирования ионов (например, экстрагирование горячей водой из золы, оставшейся после сжигания колбасы). Предлагаемый фирмой "Хьюлетт-Паккард" набор для анализа ионов может обеспечить автоматические идентификацию и количественный анализ.

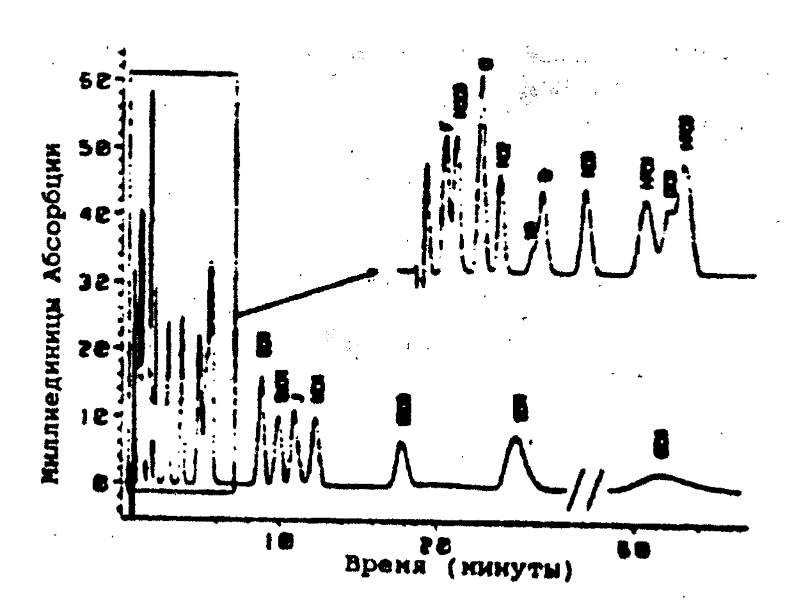
**Вещества:** Хлорид: фторид, бромид, йод, нитрит, нитрат, сульфаты, фосфаты, тиосульфат, роданид, перхлорат, нолибдат, селенат, карбонат, хлорат, азид

**Подготовка образца:** Экстрагирование изобразив обеспечивается горячей водой. Аликвотная часть может вводиться в хроматограф после фильтрации (если фильтрация требуется).

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, термостатом для колонки, .спектрофотонетрическин детектором (с изменяемой длиной волны)

**Соответствующие нетоду паранетры**: Колонках HP-1C (каталожный номер 7Э9231С-564) Подвижная фаза: вода : ацетонитрил (86:14); pH доведен до 8,6 едким натром, в котором нет карбоната Скорость протока: 1,5 мл/нин Температура: 40^C Вводимый объем: 25 мкл Используемая для обнаружения длина волны: 266 нм

**Советы и преимущества**: Ионы могут обнаруживаться и другим способом: с использованием




системы для капиллярного электрофореза

**Литература для справок**: 65

### 4.2.2.2. Анионы

**Вещества:** Хлорид, сульфат, нитрат, фторид, фосфат

**Подготовка образца**: Экстрагирование водой из твердых образцов или простое разбавление водой

**Прибор**: Система для капиллярного электрофореза Электрофореграмма: -

- Буфер с пиромеллитовой кислотой
- Косвенное обнаружение по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра; электроосмотический поток в обратном на правлении и отрицательная полярность

**Соответствующие методу параметры**: Буфер: 2,25 мМ пиромеллитиновая кислота; 6,5 мм NaOH; 0,75 мМ гидроокись гексаметона; 1,6 мМ триэтаноламин; pH 7 Отрицательная полярность; 465 В/см; 9 мкА . Капилляр: длина 64,5 см, эффективная длина 56 см, внутрен-

ний диаметр 50 микрон  Введение: 200 мбар  Температура: 25°С  Косвенное обнаружение на длине волны 350 нм (ширина полосы бОнм); контрольная длина волны 245 нм (10 нм)

**Затруднения**: Подготовка буферного раствора должна производиться в строгом соответствии с указаниями

**Советы и преимущества**: этот дополнительный метод способен подтвердить результаты анализа, выполненного с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (т.е. является независимым методом ). Такое подтверждение требуется для обеспечения соответствия нормативам. литература для справок: 95

## 4.2.3. Катионы

### 4.2.3.1. Катионы

**Вещества: Са, Na, К, Mg**

Подготовка образца: Экстрагирование водой или разбавление буферным раствором (1:10, 1:100). Помещение в ультразвуковую баню способствует процессу экстрагирования.

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза. **электрофореграмна:**

**Соответствующие методу параметры**:  Буфер: 5пМ пара-анинопиридин, рН 5,8  Капилляр: внутренний диаметр 75 микрон; эффективная длина 56 см; длина 64,5 см  Температура: 25°С Введение: -500 мбарсек  Косвенное обнаружение по поглощению света в ультрафиолетовой области; используемая длина волны: 240 нм (ширина полосы 10 нм), контрольная длина волны 210 нм (ширина полосы 10 нм)

**Затруднения:** Состав буфера должен быть подобран правильно

**Советы и преимущества**: Обнаружение производится косвенно (по поглощению света в ультрафиолетовой области). Парааминопиридин сильно поглощает свет в этой части спектра. В ходе хроматографического разделения, катионы вытесняют этот (поглощающий свет) ион. Сами исследуемые катионы не способны поглощать свет. В результате, пики получаются отрицательными. Когда в качестве контрольной выбрана та длина волны, на которой отклик на сам буфер оказывается наибольшим, отрицательные лики превращаются в положительные.

Литература для справок: 95

### 4.2.3.2. Катионы.

Анализ содержания катионов Методом ион-хроматографии весьма важен в пищевой промышленности. Питьевую воду (как и минераль ную) приходится контролировать постоянно. Хотя существуют и другие методы, ионная хроматография дает простой и универсальный анализ.

**Вещества:** Са, Na, К, Mg, аммоний

**Подготовка образца**: Измельчение или гомогенизация; разбавление 0,005 М НС1 и фильтрация.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, спектрофотометрический детектор

**Хроматограмма:** представлена в публикации 98

**Соответствущие катоду параметры:**

Колонка: для ион-хроматографии, 210; 100 **х 3,2 мн**

Подвижная фаза: 0,05 гоМ водным раствором Сег (III)

Скорость протока: 1,0 мл/мин Температура: комнатная, Вводимый объем: 20 мкл

**Советы и преимущества:** Ионообменная хроматография с косвенным фотометрическим обнаружением (при пользовании раствором Сег (III) в качестве подвижной фазы) дает возможность одновременного определения содержания ионов Na, К, Mq иСа в разбавленных молочных продуктах. Весь анализ занимает 17 минут; помех со стороны матрицы образца не наблюдалось. Кроме того, косвенное обнаружение по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра производили и благодаря замене иона уже после разделения на колонке. После того, как элюент превращался в воду (с помощью стандартной колонки, "сдирающей" анионы ОН), разделенные катионные компоненты (представляющие собой гидроксиды) пропускались через анионообменную колонку, насыщенную нафталинсульфонатом. Замена анионов ОН нафталинсульфонатом давала

возможность воспользоваться обнаружением по поглощению света в ультрафиолетовой области спектра.

**Литература** для **справок: 98,** 141, 142 .

### 4.2.4. Аминокислоты

Аминокислотный состав и уточнение белкового состава дают возможность опознать, от какого животного взято мясо.

**Вещества:** Аланин, аспарагин, цистин, цистеин, глутамат, серии, гистидин, глицин, треонин, тирозин, валин, метионин, изолейцин, фенилаланин, лейцин, лизин, пролин, оксипролин, фосфосерин, цитрин, таурин, карнозин, саркозинансерин, триптофан, оксилизин

**Подготовка образца:** Гидролиз соляной кислотой или ферментативный гидролиз могу использоваться для разрыва белковых связей. После этого, производные аминокислот получают с помощью двух различных реактивов: дйальдегид ортофталевой кислоты с 3-меркаптопропионовой кислотой [OPA] (для первичных аминов) и 9-флуоренилметилхлороформиат [FMOC] (для вторичных аминов). Получение производных обеспечивается автоматически, до нанесения образца на колонку.

. **Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, флуориметрическим детектором

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hypersil ODS; 200 x 2,1мм; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А: 100 мл (20 мМ) ацетата натрия (рН 7,2) + 0,75мл/500 мл тетрагидрофурана + 90 мкл/50 мл триэтиламина Растворитель В: 100 пл (20 мМ) ацетата натрия (рН 7,2) + 200 мл метанола + 200 мл ацетонитрила

Градиент: 0-я мин 0%В скорость протока 0,45 кл/мин 17-я мин 60%В 19-я мин 100%В скорость протока 0,8 мл/мин 24-я мин 100%в 25-я мин O%B скорость протока от 0,8 до 0,45 мл/мин

Последующее время: 4 мин

Температура; 40°С

Вводимый объем: 1 мкл

Обнаружение; Спектрофотометрическим детектором: на длинах волн 338 нм и 266 нм

Флуориметрическим детектором: Возбуждающая длина волны 340 нм Возбужденная длина волны 450нм

На 14,5 **мин:** Возбуждающая длина волны 266 нм Возбужденная длина волны 310 нм

Программа, указываемая автоматическому пробоотборнику, для получения производных перед разделением на колонке:

1 - взять 5 мкл из флакона 2 (боратный буфер) 2 - взять 1 мкл из флакона О [OPA] 3- взять О мкл из флакона 100 (вода) 4 - взять 1 мкл из флакона с образцом 5 - взять О мкл из флакона 100 (вода) б - б циклов смешивания 7 мкл 7 - взять 1 мкл из флакона I [FHOC] 8 - взять О мкл из флакона 100 (вода) 9 - 3 цикла смешивания 8 мкл 10 - введение

**Затруднения:** Некоторые специфичные образцы довольно трудно анализировать (из-за помех со стороны веществ, обладающих аминогруппами). Триптофан разрушается при гидролизе соляной кислотой. Первичные амины могут выходить из колонки с некоторыми аминокислотами. Это может приводить к неправильным результатам количественного анализа. Перечень обнаруживаемых веществ будет сокращен всеми пептидами, которые тоже будут гидролизованы.

**Советы и преимущества:** Получение производных до разделения на колонке позволяет автоматизировать этот анализ. Можно пользоваться набором принадлежностей AininoQuant., поставляемым фирмой "Хьюлетт-Паккард". К этому набору прикладываются описание метода, и все расходные материалы (включая реактивы), требуемые для анализа.

**Литература для справок**: 6б, 67, 73, 132

### 4.2.5. Оксипролин

Оксипролин - аминокислота, присутствующая (главным образок) в белках соединительных тканей. Соединительные ткани являются дешевым сырьем, употребление которого снижает качество колбас. Большинство законодательных требований в Европе ограничивает содержание этого вещества в колбасе.

**Анализ:** после подготовки образца, содержание оксипролина может быть определено или классическим спектральным методом (после получения производного соединения с нингидрином), или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматографический анализ выгоден тем, что дает возможность автоматизации и получения производных непосредственно в системе (до введения образца в колонку). При пользовании выпускаемыми фирмой "Хьюлетт-Паккард" жидкостными хроматографами серии Aminoquant, многие (входящие в состав белка) аминокислоты могут быть идентифицированы и количественно определены за одну хроматографическую разгонку. Возможно обнаружение как спектрофотометрическик детектором, так и флуориметрическим.

### 4.2.6. Красители

Запрещено искусственное окрашивание мясных продуктов. Красный или розовый цвета, свидетельствующие о свежести, ногут быть получены за счет нитротсодержащих добавок, наличие которых определяется так, как описано в подразделе 4.1.3. Добавка красителей может быть обнаружена после соответствующего экстрагирования. -

### 4.2.7. Определение вида животного

Ранее упоминавшиеся указания, касающиеся состава и определения видов мясных продуктов, уточняют допустимые к использованию виды мяса животных ( говядина, свинина, баранина ). Другие источники белка (соевый белок или искусственные белки) должны быть указаны на этикетках или не должны употребляться.

**Анализ**: традиционным методом является иммуноанализ с использованием диффузии в геле и подходящих антител. Требующиеся реактивы стоят очень дорого. На каждый анализ уходит несколько миллилитров таких реактивов. Анализ занимает несколько дней и сложно реализуем (поскольку необходимо подобрать правильную концентрацию). Если Вы не подберете сопоставимую концентрацию антитела и субстрата, не получите осаждения. Альтернативный способом может быть использование капиллярного электрофореза для анализа содержания белков. Например, можно воспользоваться экстрагированием тем же буфером (который будет употребляться при разделении) для экстрагирования в ультразвуковой бане (экстрагирование производится в течение 24 часов). Затем, обеспечивается разделение с использованием 200 мМ фосфатного буфера при pH 7 на капилляре (эффективная длина 55 см; внутренний ди-аметр25 микрон), уравновешенным буфром в течение 15 часов. Условия разделения: 400 В/см; 55 мкА.

### 4.2.8. Жир, жирные кислоты

Пропорция жира в колбасах - важный параметр, определяющий качество. Имеются индивидуальные ограничения для каждого вида колбасы. Вообще говоря, жир является одним из наиболее важных компонентов, ответственных за запах. Однако, высокие количества жира снижают качество. Информация о триацилглицеридном составе может дать представление о точном количестве жира и, дополнительно, может давать сведения о добавках постороннего жира. Добавление постороннего жира в мясные продукты дозволено, но об этом должно иметься сообщение на этикетке. Триацилглицеридный состав может определяться с помощью газовой хроматографии (как описано в подразделе 4.1.12), или можно проводить разделение в высокоэффективном жидкостном хроматографе (за 30 минут» с использованием детектора с диодной матрицей). Преимуществон такого подхода является возможность многокомпонентного анализа (триацилглииериды, перекиси, стерины и жирорастворимые витамины).

**Анализ:** интересующие вещества экстрагируются иэ roHoraKniH-рованноιо образца тетрагидрофураном; без дальнейшей обработки, образец наносится *на* колонку MOS-Hypersil (200 x2,1 мм; размер
частиц 5 микрон); градиентное изменение состава подвижной фазы . от 13% растворителя А (вода) и 87% В (ацетонмтрил/метил-трет. бутиловый эфир [9:1]) до 100 В за 25 минут; скорость протока 0,8 мл/мин; температура 40 °С; обнаружение на длиняу волн 215, 240 и 280 нм. Таким методом можно идентифицировать рафинированный жир с сопряженными двойными связями. Если имеется библиотека спектрограмм, правильность опознания может быть автоматически подтверждена благодаря библиотечному поиску.

### 4.2.9. Органические кислоты

Соли органических кислот (цитрат и лактат) используются при производстве продуктов из мяса для увеличения объема мясного белка за счет добавки воды. Этот эффект оказывается действующим не столь долго, как при добавке фосфатов (и такой подход, в отличие от случая пользования фосфатами, не запрещен). Существуют отдельные методы обнаружения каждого из веществ. Поэтому, выгодна была бы возможность анализировать содержание каждой соли, пользуясь каким-то одним методом. Содержание молочной кислоты может указать на некачественность хранения продукта и на то, что продукт не является свежим (за счет метаболического превращения микроорганизмами вырабатывается молочная кислота). Традиционный анализ методом тонкослойной хроматографии на пластинках с целлюлозой занимает несколько часов; для обнаружения требуются очень токсичные реактивы. Высокоэффективная жидкостная хроматография дает возможность анализа всех веществ за 25 минут при очень малых концентрациях (используется ионообменная колонка); гарантируются обнаружение и количественная оценка.

**Анализ**: экстрагирование подвижной фазой при 40°С, после чего производится изократическое элюирование 0,008 н. раствором серной кислоты в воде при скорости протока 0,6 мл/нин. Колонка HPX87H (фирма "BIORAD") [длина 300 мм; внутренний диаметр 7,8 мм]; обнаружение на длинах волн 190 нм и 200 нм; температура 40 С. Этот метод дает возможность определить, помимо того, содержание некоторых сахаров и спиртов (глюкоза, фруктоза, глицерин, этанол)'. Чувствительность может быть повышена благодаря использованию 8-оксихинолина для получения производных.

### 4.2.10. Мочевина

. Мочевина используется для фальсификации высокого содержания белка, регистрируемого по методу Кьельдаля (поскольку все вещества с аминогруппами дают вклад в регистрируемое количество белка). Молекула мочевины мала, но обладает двумя аминогруппами, наличие которых дает весьма завышенный процент содержания белка (1 кг мочевины подменяет 20 кг высококачественного мяса). Некоторые очень дешевые мясные продукты с очень низким содержанием белка могут обманным путем выдаваться за мясо с высоким содержанием белка. Поэтому, необходимо контролировать содержание мочевины и других аминов (например, генетических аминов, которые могут быть ответственны за мигрень и прочие недомогания).

**Подготовка образца**: к 1 г. измельченного образца добавляют 1 г. растительного угля, 250 нл воды, 5 мл Zn(OAc)g, $K_4Fe(CN)_6$ . Встряхивают, в качалке в течение 30 минут и доводят до нужного объема водой. Декантируют, пропускают раствор через фильтр Wiatman No. 40 и собирают чистый фильтрат. Пипеткой отбирают 5 мл фильтрата, добавляют 5 нл раствора п-диметиламинобензальдегида. Дают отстояться в течение 10 минут в водяной бане при температуре 25°С. Содержание регистрируют на длине 420 нм (для сопоставления анализируют и контрольный образец, не содержащий мочевины и составленный из одних лишь реактивов).

**Прибор:** спектрофотометр HP 8452A.

**Затруднения:** анализ не специфичен.

Идентификация и количественная оценка: спектральная идентификация и количественная оценка обеспечиваются за счет особенностей спектрофотометра с диодной матрицей.

Еще не разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза. Такой подход к определению более специфичен и может быть автоматизирован; исключается необходимость пользования столь вредными реактивами. Кроме того, можно приоб-

рести ферменты, дающие возможность проведения спектрального анализа. Ферментативный метод может использоваться в качестве поискового, но сами такие ферменты стоят дорого.

### 4.2.11. Ботулиновый токсин.

Ботулиновый токсин одно из наиболее токсичных веществ. Консервированные мясные продукты могут содержать микроорганизмы, вырабатывающие такой токсин (микроорганизмы развиваются только в анаэробных условиях).

### 4.2.12. Бенз(а)пирен (полиоароматическив углеводороды)

Бенз(а)пирен - полиядерный углеводород, относящийся к классу полиароматических углеводородов (английское сокращение РАН). Подозревается, что все химические соединения, входящие в эту группу, мутагенны, а наиболее вредным считается бенз(а)пирен. Анализ содержания полиароматических углеводородов с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии дает обнаружение очень низких концентраций (регистрация детектором с диодной матрицей или флуориметрическим детектором). Выделение таких углеводородов характеризуется очень хорошими степенями извлечения. Система обработки данных HPLC" ChemStation способна давать достоверные статистические результаты,, сообщаемые автоматически (т.е. обеспечивается наивысшая производительность при минимальны затратах на анализ). Предельно допустимое содержание бенз(а)пирена; 1 мкг/кг.

Анализ: в зависимости от матрицы, экстракция в аппарате Сокслета; сверхкритическое экстрагирование; твердожидкостная или жидкожидкостная экстракция. Выбор колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии: или колонка Vydac C18 со стандартным онутрепним диаметром (внутренний диаметр 4,6 мм длина 250 мм; размер частиц 5 микрон), или колонка Vydac C18 с палым внутренним диаметром (внутренний диаметр 2,1 мм длина 250 мм.
размер частиц 5 микрон). Градиентное элюирование при пользовании водой (растворитель А) и ацетонитрилом (растворитель В): 2,5 мин % В =• 60; 12 мин В = 90; 20 мин В = 100; 22,5 мин % В = 100; 25 мин % В = 60. Скорость протока 1,5 мл мин в случае колонки со стандартным внутоенним диаметром и 0,42 мл/мин в случае колонки с малым внутренним диаметром. Рекомендуется пользование хроматографом HP 1090. Обнаружение детектором с диодной матрицей на длине волны 230 ям или флуориметрическим детектором (длина волны 270 нм при ширине полосы 40 нм). Для получения наибольшей чувствительности, необходима автоматическая перенастройка на оптимальные длины волн.

### 4.2.13. Небелковый азот

Анализ небелкового азота выявляет (например) обман за счет добавок мочевины. Этот анализ производится точно так же, как определение общего содержания белка (по методу Кьельдаля), но имеет один дополнительный этап: перед гидролизом белок осаждается (для удаления азота белкового происхождения). Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии может использоваться для идентификации и количественной оценки за одну разгонку (без потерь времени). Классический способ требует сперва воспользоваться методом Кьельдаля.

### 4.2.14. Молочный белок в мясе

В некоторых специальных случаях, дозволена добавка молочного белка (например, в качестве эмульгатора при производстве колбас). Однако о такой добавке должно быть сообщено на этикетке. Добавка этого белка во все другие мясные продукты запрещена. Идентификация молочных белков сложна (поскольку анализ белков всегда непрост). Поэтому определяют другие компоненты, специфичные для молочного белка (такие, как оротовая кислота и лактоза, которые обнаруживаются ранее описанными способами [анализ органических кислот и сахаров, описанный в подразделах 3.1.5 и 4.1.8]; таким образом, обеспечиваются идентификация и количественная оценка по двум независимым и различный параметрам ).

### 4.3. Рыба и рыбные продукты

#### 4.3.1. Триметиламин в рыбе

Этот компонент является индикатором степени несвежести рыбных продуктов (вырабатывается микроорганизмами в рыбе и рыбных продуктах). Предельно допустимая величина составляет 2,51; от общего содержания азота. Для других рыбных продуктов устанавливаются иные допуска. Анализ может быть выполнен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (так, как описано на следующих страницах 4.4.2). Подготовки образца почти не требуется.

#### 4.3.2. Гистамин в рыбных продуктах

Гистамин - показатель порчи рыбы и рыбных продуктов. Этот биогенный амин является наиболее важным. Установлено специальное ограничение допустимого его содержания: 200 мкг/кг. Обычно, содержание этого амина анализируется методом тонкослойной хроматографии; обнаружение производится благодаря получению производного вещества при обработке нингидрином. Возможен и другой способ обнаружения: непосредственно на пластинках с флуоресцентным индикатором.

**Анализ:** гистамин экстрагируется из матрицы 10% раствором трихлоруксусной кислоты, после чего следует этап очистки на катионообменной колонке. После получения производного соединения используется флуориметрическое обнаружение (возбуждающая длина волны -336 нм; возбужденная - 450 нм). После гомогенизирования, генетические амины экстрагируются и очищаются на ионообменной (стеклянной) колонке. Получение производных (DABSIL-про-изводных) обеспечивается до разделения на колонке Hypersil ODS RP. Этот метод дает возможность одновременного анализа содержания свободных аминокислот, биогенных аминов (триптамина, 2-фенилэтиламина, путресцина, кадаверина, гистамина, тирамина).

#### 4.3.3. Амины

**4.3.3.1. АМИНЫ**

**Вещества**: Ацетилпутресцин, ацетилкадаверин, путресцин, кадаверин, гистамин, N--ацетилспермидин, N-ацетилспермидин, 1,7-диаминогептан (внутренний стандарт), спермидин, N-ацетилспернидин,спернин

**Подготовка образца**: Количественное содержание проверялось в биопсийных и тканевых образцах различных органов человека и животных. К образцам ткани добавляли 0,9% раствор хлористого натрия (20-кратный объем); гомогенизировали (с охлаждением льдом) [гомогенизатор модели ultra-turrax; скорость 20 000 оборотов в минуту; период обработки 4x15 сек]; затем, обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора клеток; 500 мкл гомогената смешивали со 100 мкл внутреннего стандарта. Для осаждения белков добавляли 1,-4 мл 0,2 М раствора соляной кислоты; затем центрифугировали в течение 5 мин при 3200 д. Супернатант фильтровали (размер пор фильтра 0,22 микрона). Производные можно было получать и до разделения на колонке (согласно методике, описанной для анализа аминокислот). .

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающий смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, флуориметрическим детекторон, системой для получения производных после разделения на колонке

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hyperail ODS; 150 x 3,9 мм, размер частиц 4 микрона.

Подвижная фаза; Растворитель А; 0,1 М раствор ацетата натрия, доведенный до pH 4,5 уксусной кислотой, + 0,01 М раствор натриевой соли октансульфокислоты Растворитель В: 0,2 М раствор ацетата натрия (pH 4,5)+ ацетонитрил (отношение объемов 10:3); + 0,01 М раствор натриевой соли октансульфокислоты

Градиент: 0-я мин 10%В 40-я нин lOO%B 45-я нин 100%В 46-я нин IO%B Скорость протока: 1,5 нл/мин Температура: 35^С Используеные для обнаружения длины волн (для флуориметри-ческого детектора): Возбуждающая длина волны: 345 нм Возбужденная длина волны: 466 нм

Использовалось получение производных после разделения на колонке (с помощью диальдегида ортофталевой кислоты и 2-меркап-тоэтанола при 45^С)

**Затруднения**: Для получения производных после разделения на колонке требуются второй насос и смесительное устройство.

**Советы и преинущества**: Благодаря употреблению другого профиля градиентного изменения, можно было ускорить разделение. Однако при таком ускорении не удается разделить все амины (такие, как кадаверин, ацетилкадаверин); в частности, из образцов тканей. При таком (другом варианте) градиентного изменения, продолжительность анализа составляла 17 минут.

**Предел обнаружения аминов:** 0,5 - 1,0 пкмоль с исключительной линейностью в диапазоне от 3 пкмоль до уровня, свыше 10 пкмоль.

Для разработки быстрого, удобного метода рутинного анализа, были максимально снижены затраты времени на все этапы подготовки образца и количественного анализа.

**Литература для справок**: 75133

## 4.3.2.2. АМИНЫ

В то время, как описанные выше параметры давали возможность определения содержания всех полиаминов в тканях, сыворотке и моче за 56 минут, рассмотренный ниже вариант градиентного изменения состава подвижной фазы использовался для быстрого анализа содержания полиаминов в образцах, в которых нет кадаверина или ацетилкадаверина (например, в образцах некоторых тканей).

**Вещества**: Ацетилпутресцин, ацетилкадаверин, путресцин, кадаверин, гистамин, N-ацетилспермидин, N-ацетилспермидин, 1,7-диаминогептан (внутренний стандарт), спермидин,N-ацетилспермидин, спермин

**Подготовка образца:** Количественное содержание проверялось в биопсийных и тканевых образцах различных органов человека и животных. К образцам ткани добавляли 0,9% раствор хлористого натрия (20-кратный объем); гомогенизировали (с охлаждением льдом) [гомогенизатор модели ultra-turrax; скорость 20 000 оборотов в минуту; период обработки 4x15 сек]; затем обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора клеток; 500 мкл гомогената смешивали со 100 мкл внутреннего стандарта. Для осаждения белков добавляли 1,4 мл 0,2 М раствора соляной кислоты; затем, центрифугировали в течение 5 мин при 3200 g. Супернатант фильтровали (размер пор фильтра 0,22 микрона). Производные можно было получать и до разделения на колонке (согласно методике, описанной для анализа аминокислот).

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, флуориметрическим детектором, системой для получения производных после разделения на колонке.

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: Hypersil ODS; 150 x 3,9 ми; размер частиц 4 микрона. Подвижная фаза: Растворитель А: 0,1 М раствор ацетата натрия, доведенный до pH 4,5 уксусной кислотой, + 0,01 М раствор натриевой соли октансульфокислоты Растворитель В: 0,2 М раствор ацетата натрия (pH 4,5) + ацетонитрил (отношение объемов 10:3); + 0,01 М раствор натриевой соли октансульфокислоты Градиент: 0-я мин 50%В 10-я мин 75%В 12-я мин lОО%В 16-я мин 100%В .. 17-я мин 50%В 25-Я МИН. 50%В . Скорость протока: 1,5 мл/иин Температура: 35°С Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметрического детектора): Возбуждающая длина волны; 345 нн Возбужденная длина волны: 466 нн.

Использовалось получение производных после разделения на колонке (с помощью диальдегида ортофталевой кислоты и 2-меркаптоэтанола при 45°С)

**Затруднения:** Для получения производных после разделения на колонке требуются второй насос и смесительное устройство.

**Советы и преимущества:** При пользовании таким профилем градиентного изменения, можно было ускорить разделение. Однако при этом не удается разделить все амины (такие, как кадаверин, ацетилкадаверин); в частности, из образцов тканей. При таком градиентном изменении продолжительность анализа составляла 17 минут. Предел **обнаружения** аминов:

0,5 - 1,0 пкмоль *с* исключительной линейностью в диапазоне от 3 пкмоль до уровня, свыше 10 пкмоль.

Для разработки быстрого, удобного метода рутинного анализа были максимально снижены затраты времени на все этапы подготовки образца и количественного анализа.

**Литература для справок:** 133, **162**

**4.3.3.2. Амины**

Содержание биогенных аминов - хороший индикатор свежести пищевых продуктов. Ниже рассмотрен метод анализа первичных и вторичных аминов. В качестве реактива для получения производных использовался 9-флуоренилметилхлорформиат (FMOC-CL).

**Вещества:** Тирамин, в-фенилэтиланин, путресцин, гистамин, кадаверин, спернидин, спермин

**Подготовка образца**: Образец смешивался с 0,1 н. соляной кислотой (образец: HC1 = 2:1). После гомогенизирования, 40 мл 0,1 н. раствора HC1 добавляли к 30 г смеси (что соответствует 20 г ткани рыбы). Проводили центрифугирование, супернатант сливался для анализа. Процесс экстрагирования повторялся снова 40 мл кислоты и, затем, 20 мл кислоты. Отделенный раствор (супернатант) доводился до 100 мл соляной кислотой. Этот раствор сразу же подвергали анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для хранения требовалась температура - 30°C.

Производные получали следующим **образом;** 50 мкл образца добавляли к 200 мкл боратного буфера (0,2 М борная кислота, с доводкой pH до 8,5 с помощью 30% KOH). Кроме того, добавляли 200 мкл 9-флуоренилметилхлорформиата (FMOC-CL); полученный в итоге раствор перемешивали в течение 3 минут. Для удаления избытка FHOC-CL добавляли 50 мкл гептиламина. Через 3 минуты 80 мкл раствора разбавляли добавкой 320 мкл подвижной фазы.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, термостатом для колонки, флуориметрическим детектором.

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: Hypersil ODS; 150 x 3,9 мм; размер частиц 4 микрона. Подвижная фаза: Растворитель А: 0,1 М раствор ацетата натрия, доведенный до pH 4,4 уксусной кислотой + 50% ацетонитрила. Растворитель В: ацетонитрил. Градиент: 0-я мин 0%В 8-я мин 0%В - 12-я мин 10%В 27-я мин 30%В 32-я МИН 30%в 37-я мин 80%в 40-я МИН 100%В Скорость протока: 1,2 мл/мин. Температура: 35°C. Используемая для обнаружения длина волны (при работе со спектрофотометрическим детектором): 265 нм. Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметри-ческого детектора): Возбуждающая длина волны: 345 нм. Возбужденная длина волны: 466 нм.

**Затруднения:** Избыток реактива, используемого для получения производных, должен полностью удаляться гептиланином. Правильность доводки pH существенно влияет на степень извлечения.

**Советы и преимущества**: Все этапы, соответствующие получению производных, могут быть полностью автоматизированы (при пользовании автоматическим пробоотборником). Информация о метрологической оценке метода описана в публикации 162. Отклик флуориметрического детектора на некоторые аминокислоты был слишком слабым. Обнаружение этих веществ может производиться спектрофотометрическим детектором, настроенным на длину волны 265 нм.

**Литература для справок:** .133,162

### 4.3.4. Сакситоксин в мидиях и морепродуктах

#### 4.3.4.1. Сакситоксия в мидиях и морепродуктах (вызывающие понос токсины)

Конкретные виды рыб, моллюсков и ракообразных могут содержать токсины, вырабатываемые водорослями (эти токсины могут привести к смерти после употребления в пищу). Специальные требования к слежению за морскими фикотоксинами могут предусматривать экологический надзор за токсичными веществами, накапливающимися в водорослях. Поэтому, некоторые страны разработали специальные программы слежения за состоянием фитопланктона. Фактически предложенный допустимый уровень для вызывающего понос яда (этот яд обозначается английским сокращением DSP), иногда обнаруживаемого в моллюсках и ракообразных: 40 - 80 мкг/100 г. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии дает возможность разделения и идентификации

индивидуальных токсинов, входящих в состав такого яда. Подобный подход открывает новые возможности анализа фикотоксина.

**Вещества:** Окадаиновая кислота (OA), динофизистоксины (DTX), гребешковые токсины (PTX), ессотоксин {YTX)

**Подготовка образца:** Усовершенствован способ подготовки образца, предложенный Lee с соавторами. Первый этап сводится к экстрагированию гомогенизированного образца смесью метанола с водой (80:20), после чего обеспечивается очистка полученного экстракта н-гексаном. Попытка воспользоваться 4-бромэтил-7-мет-оксикумарином (BrMmc) для получения флуоресцирующих производных показала, что такой степени очистки не достаточно. Поэтому, была предложена дополнительная операция, сводящаяся к использованию патрона Sep-Pak с фазой С-18 для дополнительной очистки.

Получение производных с помощью 9-антридиазолметаиа (ADAM): 0,8 мл экстракта, полученного с помощью дихлорметана, помещают в реакционный флакон на 1,5 мл и просушивают азотом. Остаток растворяют в 0,1 мл раствора ADAM (0,05% в ацетоне). Смесь выдерживают в течение 2 часов при 30°C, избегая воздействия света. После охлаждения, раствор готов для введения в высокоэффективный жидкостный хроматограф.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, флуориметрическим детектором.

Соответствующие методу параметры: Колонки: для предварительного разделения: RP-C8; 250 x 4 мм. , для концентрирования: RP-C18; 300 x 4 мм, для анализа: RP-C18; 250 x 4 мм ,Подвижная фаза: Растворитель А:ацетонитрил/вода (55/45) . Растворитель В: ацетонитрил/вода (85/15) . Скорость протока 1: 1,5 мл/мин . Скорость протока 2: 1,2 мл/мин . Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметрического детектора): возбуждающая:. 365 нм ; возбужденная: 412 нм.

**Затруднения**: Пользование реактивами, позволяющими получать флуорисцирующие производные (ADAM и [или] BгMгac), дает возможность работать с флуориметрическим детектором для обнаружения токсинов DSP. Ошибок, связанных с обнаружением производных 9-антридиазолметана (ADAM), удается избежать за счет пользования системой переключения колонок в высокоэффективном жидкостном хроматографе.

**Советы и преимущества:** При пользовании рассмотренным методом, удается получать хроматограммы с острыми пиками интересующих веществ (9-AM-OA и 9-AM-DTX-1).

**Литература** для **справок:** 76, 77, 78,79, 80, 134, **135**

### 4.3.4.2. Сакситоксин в мидиях и морепродуктах ( вызывавщие понос токсины )

Конкретные виды рыб, моллюсков и ракообразных могут содержать токсины, вырабатываемые водорослями (эти токсины могут привести к смерти после употребления в пищу). Специальные требования к слежению за морскими фикотоксинами могут предусматривать экологический надзор за токсичными веществами, накапливающимися в водорослях. Поэтому, некоторые страны разработали специальные программы слежения за состоянием фитопланктона. Фактически предложенный допустимый уровень для вызывающего понос яда (этот яд обозначается английским сокращением DSP), иногда обнаруживаемого в моллюсках и ракообразных: 40 - 80 мкг/100 г. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии дает возможность разделения и идентификации индивидуальных токсинов, входящих в состав такого яда. Подобный подход открывает новые возможности анализа фикотоксина. -

**Вещества:** Окадаиновая кислота (OA), динофизистоксины (DTX)

**Подготовка образца**: Усовершенствован способ подготовки образца, предложенный Lee с соавторами. Первый этап сводится к экстрагированию гомогенизированного образца смесью метанола с водой (80:20), после чего обеспечивается очистка полученного экстракта н-гексаном. Попытка воспользоваться 4~бронэтил-7-мет-оксикумарином (BгMmc) для получения флуоресцирующих производных показала, что такой степени очистки не достаточно. Поэтому, была предложена дополнительная операция, сводящаяся к использованию патрона Sep-Pak с фазой С-18 для дополнительной очистки.

**Получение производных с помощью 4-бронэтил-7-нетоксикумарина (BrMmc)**: 1,6 мл экстракта, полученного с помощью дихлорметана, помещают в реакционный флакон на 4 мл и просушивают азотом. Остаток растворяют в 140 мкл ацетона и добавляют 10 мкл 18-краун эфира-б (0,1% в ацетоне). Добавляют 50 мкл раствора 4-бром-этил-7-метоксикумарина (0,15% в ацетоне) и 1 мг $K_2CO_3$ . смесь выдерживают в течение 2 часов при 55°С. После охлаждения, раствор готов для введения в высокоэффективный жидкостный хроматограф.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающий смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, флуориметрическим детектором

**Соответствующие методу параметры**:
Колонка: Nucleosil 5-C18; 250 х 4 мм
Подвижная фаза: ацетонитрил/вода (70:30)); Скорость протока: 0,5 мл/мин ;
Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметрического детектора): возбуждающая: 325 нм возбужденная: 390 нм

**Затруднения**: Пользование реактивами, позволяющими получать флуоресцирующие производные, (ADAM и [или) BrMmc), даст возможность работать с флуориметрическим детектором для обнаружения токсинов DSP. Ошибок, связанных с обнаружением производных 9-антридиазолметана (ADAM), удается избежать за счет пользования системой переключения колонок в высокоэффективном жидкостном хроматографе.

**Советы и преимущества:** При пользовании рассмотренным методом, удается получать хроматограммы с острыми пиками интересующих веществ (9-AM-OA и 9-AM-DTX-1). Требуются получение производных с помощью 4-бромэтил-7-метоксикумарина (BгMюс) и дополнительный этап твердофазного экстрагирования на патроне Sep-Pak C-18. Обнаружение по способности к флуоресценции дает возможность чувствительного и селективного определения содержания двух наиболее важных токсинов DSP. Успешно пользовались и комплексом "жидкостный хроматограф - масс-спектрометр".

**Литература для справок; 76,** 77, 78,79, 80, 134, **135**

### 4.3.4.3. Сакоитоксии в мидиях и морепродуктах (токсины паралитического действия [PBP])

Вид и число веществ, относящихся к группе PSP, в моллюсках ракообразных зависит от характера ядов, вырабатываемых динофлагеллятами; от условий хранения продуктов; от метаболизма этих веществ в моллюсках и ракообразных. Помимо разнообразия химической структуры, отмечается и различная токсичность отдельных веществ, относящихся к группе PSP. Вполне возможно ферментативное преобразование этих химических соединений, при котором гидролиз веществ, содержащих N-сульфокарбамоил, приводит к получению более ядовитых токсинов, содержащих карбамат и декарбамоил.

**Вещества**: Сакситоксин (STX); 1-оксисакситоксин (.NEO); сульфат И-оксисакситоксина; сульфат 11-оксинеосакситоксиия; гониатоксины 1, II, III, IV (GTX I, II, III, IV)

**Подготовка образца**: 1 г гомогенизированного образца помещают в реакционный флакон. Добавляют 3 мл 0,03 н. уксусной кислоты и тщательно перемешивают. Смесь выдерживают в течение 10 минут при lOO °С и в течение некоторого периода встряхивают. Сразу же после этого, смесь центрифугируют 30 минут при 1000g. Супернатант пропускают через фильтр с размером пор 0,45 микрон. Чистый раствор используют для получения производных. К нему добавляют эквивалентный объем соляной кислоты (0,2 н.) и опять выдерживают в течение 10 минут при 100°С. Раствор снова фильтруют и подвергают анализу с помощью высокоэффективной жидкостный хроматографии.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, изократическин насосом для получения производных после разделения на колонке, флуориметрическим детектором.

**Хроматограмма:** приведена в **публикации 80**

Соответствующие методу параметры:
Колонка: RP-C18; 250 х 4,0 мм

Подвижная фаза; растворитель А: 98,5% 40 мМ буфера из фосфата аммония; pH 6,6 (доводка 1-октансульфокислотой [натриевой солью]; под раствор этой кислоты уходят оставшиеся 1,5% объема) растворитель В: 83,5% 50 мМ буфер из фосфата аммония; pH 6,6 (доводка 13 мМ 1-октансульфокислотой), 15% ацетонитрила, 1,5% тетрагидрофурана.

Градиент: О мин 0%В 15,5 мин 100%В 30,5 мин 100%В 31 мин 0%В 55 мин 0%В Скорость протока: 0,8 мл/мин Вводимый объем: 20 мкл Используемые для обнаружения длины волн (для флуориметрического детектора): возбуждающая: 335 нм возбужденная: 396 нм Получение производных после разделения на колонке; скорость протока 0,33 мл/мин; делитель потоков: 1) 10 мМ $H_5IO_6$ ; 2) 550 нМ $NH_4OH$; 3) 1000 мМ оксиуксусная кислота; длина реактора; 10 м; объем: 1 мл.

**Советы и преимущества:** Описан и другой способ, использующий ион-парную хроматографию. В качестве ион-парных реактивов употребляли гептансульфокислоту и гексансульфокислоту. Карбаматные токсины удачно разделялись на колонке, заполненной сополимером полистирола с дивинилбензолом. Кроме того, выгодно пользоваться комплексом "жидкостный хроматограф - масс-спектрометр". Все условия описаны в публикации 137.

**Литература для справок**: **80,** 134, 136, 137

## 4.4. Жиры и масла

Жиры и масла состоят, в основном, из тройных эфиров глицерина с разным набором жирных кислот (которые обычно называют триацилглицеридами). Жиры получают из овощных культур, источников животного и морского происхождения. Часто жиры оказываются побочными продуктами, образующимися при синтезе белков и клетчатки в овощных культурах; белков в животных и морских организмах.

Все типы жиров издревле используются в качестве пищевых продуктов. Химическая структура жиров оказывается весьма сложной из-за различных сочетаний и перестановок жирных кислот, которые могут этерифицироваться у трех гидроксильных групп глицерина.

Триацилглицериды могут подразделяться (по жирнокислотному составу) на жиры и масла.

Жиры характеризуются высокой плотностью при комнатной температуре и содержат, главным образом, насыщенные жирные кислоты.

Триацилглицериды с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот остаются при комнатной температуре жидкими. Они относятся к маслам.

Во многих случаях, триацилглицериды имеют вид полимеров. От кристаллической структуры существенно зависят свойства маргарина, комбижиров и других специальных жиров. Очень нестабильная форма *а* часто превращается в более стабильную форму *fi* (типичную для некоторых триацилглицеридов с более высокой точкой плавления).

В научных целях и при контроле качества, интересуют опознание различных конформаций и определение количественного содержания жирных кислот.

Много внимания уделяется анализу жирнокислотного состава масел. В большинстве случаев, анализу предшествует переэтерификация триацилглицеридов с преобразованием в метиловые эфиры (после чего содержание метиловых эфиров исследуется методом газовой хроматографии). Переэтерификация не всегда количественна и свободные жирные кислоты не вовлечены в процесс образования производных (такие жирные кислоты не превращаются в метиловые эфиры и остаются в устройстве для введения образца, поскольку не являются летучими соединениями).

При анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии может использоваться (при работе с любым растворителем) детектор по светорассеянию. Важной особенностью такого детектора является крайне малая степень фона (если малы пульсации потока, создаваемого насосом).

Методы анализа триацилглицеридов, метиловых эфиров жирных кислот, свободных жирных кислот и многокомпонентный анализ жиров и масел уже описаны в разделе "Молоко". Для ознакомления с подобными анализами, см. (пожалуйста) этот раздел. Далее рассматриваются лишь дополнительные варианты анализов.

### 4.4.1. Токоферолы (противоокислители)

Витамином Е называют группу токоферолов, характеризующихся некоторой степенью активного действия в качестве витаминов. Эти вещества обладают также важнейшими противоокислительными и питательными свойствами. Поэтому, их часто употребляют в виде пищевой добавки к различным видам пищевых продуктов. Определение содержания пищевых добавок - важнейшее требование, принятое странами Общего рынка. Для слежения за качеством пищевых продуктов, важны идентификация и оценка количественного содержания.

**Анализ**: образец подготавливают растворением в гексане, после чего обеспечивается разделение на колонке Hypersil с малым внутренним диаметром (длина 100 мм; внутренний диаметр 2,1 мм; размер частиц 5 микрон) [каталожный номер колонки: 79916SI-552). В качестве подвижной фазы используется смесь гексана с изопропанолом; скорость протока 0,45 мл/мин; разделение при комнатной температуре; вводимый объем образца 5 мкл; обнаружение на длине волны 295 нм (ширина полосы 4 нм) или 420 нм (ширина полосы 20 нм).

### 4.4.2. Определение степени рафинации жира

Рафинация жира влияет на жирнокислотный состав. Число ненасыщенных двойных связей зависит от такой обработки. Для рафинированных жиров и масел характеристичны изолированные и менее сопряженные диеновые связи, что приводит к типичному виду спектрограмм, зарегистрированных в диапазоне длин волн от 230 до 240 нм. Однако, отмечается и более высокая степень сопряжения двойных связей (триеновые и иногда даже тетраеновые связи). В процессе старения жира число диеновых связей возрастает; число триеновых и тетраеновых связей остается тем же самым.

Отличить рафинированные жиры и масла от тех, которые не подвергались такой обработке, можно благодаря сопоставлению спектрограмм, получаемых до контрольной рафинации и после нее.

К 0,25 г масла или жира добавляют 100 мл изооктана. Снимается спектрограмма в диапазоне от 225 до 300 нм (спектрограмма 1).

10-20 г масла смешивают с 0,2 г отбеливающего вещества (бентонита) и выдерживают в течение 1 часа при 100°С. Затем, смесь охлаждают до комнатной температуры и профильтровывают. Снимается еще одна спектрограмма в диапазоне от 225 до 300 нм (спектрограмма 2).

Спектрограммы 1 и 2 сопоставляются с учетом следующих особенностей:

Зона поглощения света изолированными двойными связями: <210 нм

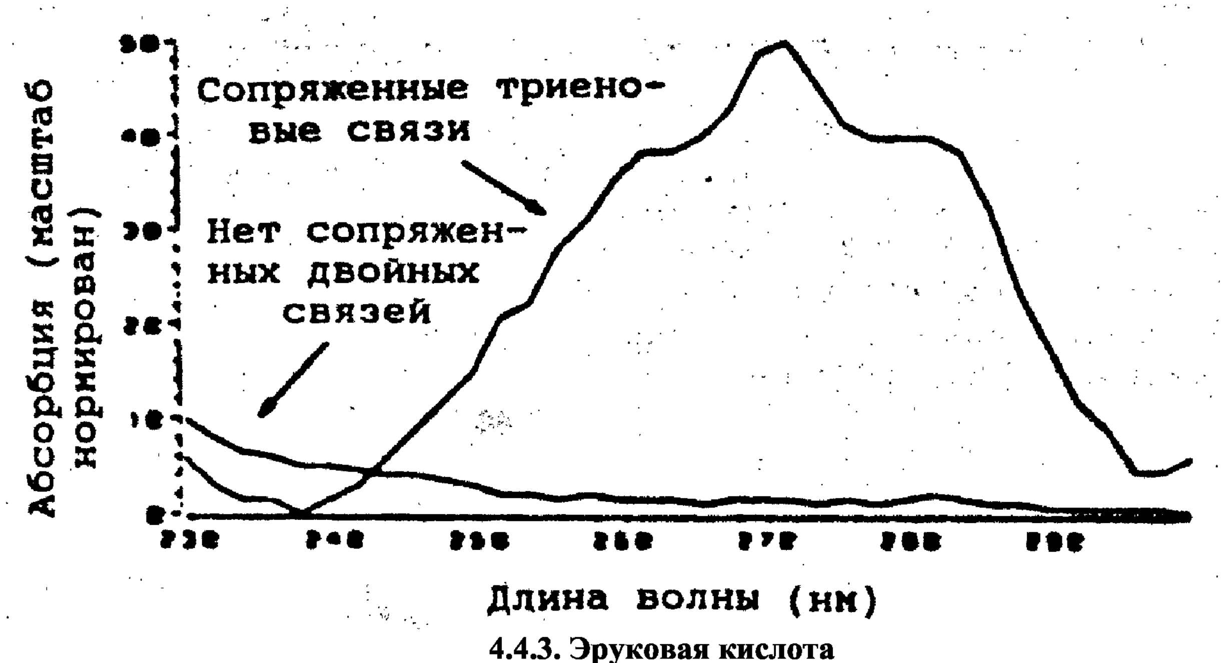
Зона поглощения света сопряженными диеновыми связями: 230-240 нм

Зоны поглощения света сопряженными триеновыми связями: 3 зоны: 258, 268 и 279 нм

Зона поглощения света сопряженными тетраеновыми связями: 300 - 316 нм

Если триеновые связи обнаруживаются в необработанных маслах (жирах) и единственным отличием спектрограммы 1от спектрограммы 2 является снижение поглощения света сопряженными диеновыми связями, масло (жир) можно считать подвергавшимися очистке (рафинации ).






**4.4.3. Эруковая кислота**

По соображениям безопасности для здоровья, содержание эруковой кислоты в пищевых продуктах ограничено уровнем в 5% от суммарного содержания свободных жирных кислот. Анализ должен выполняться общим методом, принятым для стран Общего рынка (метод с метилированием благодаря пользованию фторидом бора). Кроме того, метиловые эфиры жирных кислот могут быть получены за счет обработки гидроокисью тетраметиламмония (ТМАН).

**Вещества:** Жирные кислоты (от С-4 до С-24); эфиры пропионовой, уксусной, масляной, валериановой, капроновой, лауриновой, энтановой, тетрадекановой,гексадекановой, октадекановой, эйкозановой кислот, цис-9-гексадеценовая (цис-пальмитолеиновая) кислота; транс-9-гексадеценовая (транс-пальмтолеиновая) кислота; октадекановая (стеариновая) кислота; цис-9-октадеценовая (олеиновая) кислота; транс-9-октадеценовая (элаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-окта-декандиеновая (линолевая) кислота; транс-9-транс-12-октадекадиеновая (линолелаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-цис-15-октаде-катриеновая (линоленовая) кислота

**Подготовка образца**: Жир (100-200 мг) растворяется диэтиловым эфиром (3 мл) и подвергается переэтерификации за счет добавления 200 мкл 20% раствора гидроокиси тетраметиламмония (ТМАН). Смешивание производится в течение 2 минут. Затем, добавляется вода; производится тщательное перемешивание для получения двух фаз. Аликвотный объем из фазы эфира вводится в газовый хроматограф.

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

Соответствующие методу параметры: Колонка: кварцевая капиллярная, CB Sil 88 (аналог колонке Силар 10С); длина 50 н; внутренний диаметр 0,2 мн; толщина пленки фазы 0,2 микрона
Температура колонки: 160°С в течение 2 минут; до 220 °С за 16 минут со скоростью 4 °С/мин
Температура устройства для введения образца: 250 °С Температура головки детектора: 250°С
Газ-носитель: азот Коэффициент деления потока: 1:90

**Хроматограмма:** см. публикацию 82

**Затруднения:** На момент добавления гидроокиси тетраметиламмония (ТМАН), жир не должен содержать воду.

**Советы и преимущества**: Описанный здесь метод реализуется быстрее, чем стандартный (основанный на пользовании трехфтористым бором в качестве реактива для получения производных). Для арбитражного подтверждения правильности заключения, следует воспользоваться описанным ниже методом.

Жир экстрагируют; затем, благодря добавлению NaOH и трехфтористого бора, получают метиловые эфиры жирных кислот, разделение которых производят на кварцевой капиллярной колонке CB Sil 88 (длина 50 м; внутренний диаметр 0,2 мм; толщина пленки фазы 0,2 микрона). Запрограммированное изменение температуры: 16O°С в течение 2 минут; затем до 200 °С в течение 16

нинут (со скоростью 4°С/мин). Температуры устройства для введения образца и головки детектора: 250°С. Коэффициент деления потока: 1:90. Газ-носитель: азот.

Далее описан другой подход к анализу свободных жирных кислот (с помощью жидкостной хроматографии).

**Литература для справок**: 81,82,

### 4.4.4. Свободные жирные кислоты

Для решения различных прикладных задач, полезен аналитический метод, дающий возможность рутинного одновременного опознания и определения количественного содержания различных жирных кислот.

Вещества: цис-9-гексадеценовая (цис-пальмитолеиновая) кислота; транс-9-гексадеценовая (транс-пальмитолеиновая) кислота; октадекановая (стеариновая) кислота; цис-9-октадеценовая (олеиновая) кислота; транс-9-октадеценовая (элаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-октадекандиеновая (линолевая) кислота; транс-9-транс-12-октадекадиеновая (линолелаидиновая) кислота; цис-9-цис-12-цис-15-октадекатриеновая (линоленовая) кислота

Жирные кислоты (от С-4 до С-24); эфиры пропионовой, уксусной, масляной, валериановой, капроновой, лауриновой, энтановой, тетрадекановой, гексадекановой, октадекановой, эйкозановой кислот.

**Подготовка образца**: Жир растворяют диэтиловым эфиром.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны).

Хроматограмна: см. публикацию 98.

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: Hypersil ODS; 250 x 4,6 мм; размер частиц 5 микрон Подвижная фаза: тетрагидрофуран/ацетонитрил/фосфорная кислота (21,6/50,4/28,0) При pH 2,2 Скорость протока: 1,5 мл/мин Температура: 35°С Используемая для обнаружения длина волны: 220 нн

**Затруднения**: Окисление полиненасыщенных жирных кислот ведет к появлению окисленных молекул с парами сопряженных двойных связей. Продукт линолевой кислоты имеет экстинкцию около 28 000 на длине волны 232 нм. Следовые количества таких продуктов окисления в стандартах полиненасыщенных жирных кислот, характеризующихся чистотой 99%, будут давать относительно большие пики при регистрации на этой длине волны.

**Советы и преимущества:** В публикациях 71 и 98 описан третий способ использования высокоэффективной жидкостной хроматографии, основанный на получении фенациловых эфиров (способных к поглощению света в ультрафиолетовой области спектра) перед раэделением на колонке или уже после такого разделения.

**Литература для справок**: 98

### 4.4.5. Спирты алифатического ряда в маслах, подвергшихся переэтерификации

В европейском указании сформулированы требования к оливковому маслу и требуется проведение анализа всех веществ, ответственных за его качество. Требования к качеству во всех странах общего рынка одинаково. Результаты анализа характеристик качества должны быть сопоставимыми. В частности, в европейском указании описан метод анализа спиртов алифатического ряда.

**Вещества**: Спирты алифатического ряда

**Подготовка образца**: 5 г образца (+ 250 мкл внутреннего стандарта) просушивают током азота. Добавляют 50 мл 2 н. КОН и смесь подогревают в сосуде с обратным холодильником (до температуры около 150°С) в течение 20 минут. После добавления 50 мл воды, смесь охлаждают до ЗО С. Дважды проводят жидкожидкостное экстрагирование эфиром (по 80 мл). Эфирную фазу просушивают. После очистки, получают производные спиртов с помощью смеси триметилхлорсилана и гексаметилдисалазана в пиридине (TMSE). Раствор вводят (для анализа) в газовый хроматограф.

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором; введение образца с делением потока

**Хроматограмма:** см. публикацию 112

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: кварцевая капиллярная, с фазой SE-52; длина от 20 до 30м; внутренний диаметр 0,25 или 0,32 мм; толщина пленки фазы от 0,1 до 0,3 микрона Температура колонки: 180°С в течение 8 минут; затем, до 260°С со скоростью 5 С/мин; выдержка при 260°С в течение 15 минут Температура устройства для введения образца: 280°С Температура головки детектора: 290 С Газ-носитель: гелий; 20-35 см/сек (водород; 30-50 см/сек) Деление потока: 1/50 - 1/100 Внутренний стандарт: 1-эйкоэанол

**Затруднения:** Процесс получения производных должен протекать при полном отсутствии воды. Вода портит реактивы!

**Советы и преимущества:** Когда капиллярные колонки используются впервые, необходимо их предварительное кондиционирование в течение (по меньшей мере) 2 часов при температуре на 20°С выше максимальной устанавливаемой при анализе. На базовой линии не должно иметься посторонних пиков; базовая линия должна представлять собой прямую линию (без уходов).

**Литература для справок: 112**

### 4.4.6. Летучие галогенсодержащие углеводороды

Этот анализ дает возможность исследовать не только пищевые продукты, но и загрязнение окружающей среды (например, воду; не требует даже дополнительного упоминания важности сохранения чистоты питьевой воды). Все галогенизированные углеводороды остаются в организме (после попадания в него с пищей). Поэтому, уровень загрязнения ими должен быть минимально малым. Слежение за содержанием этих веществ - одна из основных задач, решаемых органами надзора для охраны здоровья человека. Существуют очень строгие ограничения для воды и всех пищевых продуктов, предусмотренные национальными законодательными требованиями, действующими во всех странах Европы. Пользуясь поставляемыми фирмой "Хьюлетт-Паккард" ловушкой с концентратором и газовым хроматографом очень легко проследить содержание этих веществ на крайне низких уровнях (до триллионных долей). Сочетание фото-ионизационного детектора и детектора по электропроводности дает более достоверное, селективное обнаружение. Таким оборудованием обеспечиваются все требования к анализу питьевой воды, описанные в методах, разработанных Агентством охраны окружающей среды США.

**Вещества:** Летучие галогенсодержащие углеводороды

**Подготовка образца:** Используется концентратор с ловушкой

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный фотоионизационным детектором, детектором по электропроводности, концентратором с ловушкой

**Соответствующие методу парам етры:** Колонка: поставляемая фирмой "Хьюлетт-Паккард" колонка FFAP; 50 м х 0,32 мм; толщина пленки фазы 1 микрон

- Концентратор с ловушкой: количество образца: 5 -10 мл Ловушка: 0.1.С.#6 (Тенакс, силикагель, растительный. уголь) Продувка: гелием, в течение 12 минут при скорости 30 мл/мин при температуре 25°С Десорбция: за 1 минуту при 18°С Прокаливание: в течение 2 минут при 200 С Нагрев канала переноса и клапана: 120 С
- Газовый хроматограф HP S890 (Серия II): Температура термостата: 35°С (8 мин); 5°С/мин до200°С; *200°С* (2 мин) Деление потока с использованием системы электронного регулирования давления; соответственно температуре *200°С* Температура головок пламенно-фотометрического детектора и детектора по электропроводности: 200 С Газ-носитель: гелий; 2 - 3 мл/мин Поддувочный газ для детектора по электропроводности и пламенно-фотометрического детектора: гелий; 20 мл/мин Газ-реактант для детектора по электропроводности и пламенно-фотометрического детектора: водород; 100 мл/мин

**Литература для справок:** 112

### 4.4.7. Альдегиды

Обнаруживаемые в жире альдегиды и кетоны являются продуктами разрушения. Это разрушение обуславливается воздействием ультрафиолетового излучения (как части солнечного света). Под таким воздействием образуются радикалы; при окислении, разрывается углеродные цепи жирных кислот. Реакция Мэилларда - еще одна причина разрушения (при нагреве). При нагреве

образуются альдегиды (реакция Штреккера), что позволяет понять, какой обработке подвергались пищевые продукты.

**Вещества:** Альдегид, этилацетат, метанол, этанол, н-пропа-нол, изопропанол, 2-метил-1-бутанол, 3-метил-1-бутанол, уксусная кислота

**Подготовка образца:** Непосредственное введение в хроматограф; введение с помощью парофазного автоматического пробоотборника или экстрагирование подходящим растворителем

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и системой электронного регулирования давления

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: HP-INNOWAX; 30 м x 0,25 ММ x 0,25 микрон Температура колонки: 35°С в течение 5 минут; со скоростью 5°С/мин до 150°С; со скоростью 20°С/мин до 250°С; 250°С в течение 2 минут Температура устройства для введения образца: 220°С Температура головки детектора: 275°С Поддувочный газ: азот; 25 мл/мин Топливные газы: водород (30 мл/мин) и воздух (250 мл/мин) Газ-носитель: гелий; 33 см/сек; 15,5 фунтов на кв. дюйм (35°С) Коэффициент деления потока: 1/25 Вводимый объем: 1 мкл

**Хроматограмма:** показана в публикации 112 (стр. 9)

**Затруднения**: Кетоны могут мешать разделению. Выбор подхода к подготовке образца зависит от интересующих веществ.

**Советы и преимущества**: Разделение этих веществ может быть обеспечено и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для установления структуры, рекомендуется пользоваться системой с масс-спектрометром. Масс-спектрометр может быть подключен к газовому хроматографу или к высокоэффективному жидкостному хроматографу. Кетоны и альдегиды удается разделить за одну разгонку в высокоэффективном жидкостном хроматографе.

Литература для **справок:** 112

### 4.4.8. Фосфолипиды

Эти вещества используются в пищевой промышленности (главным образом) в качестве эмульгирующих. В маргаринах, майонозах и шоколаде, употребляют лецитин для улучшения выпечки, предотвращения черствения (кроме того, такое вещество является противоокислителем). В последние годы показано, что эти вещества могут способствовать лечению заболеваний, связанных с повышением содержания липидов в крови и с атеросклеротическими изменениями проницаемости сосудов.

**Вещества**: Фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин (PE), фосфатидилинозитол (P1), фосфатидная кислота (PA), фосфатидил-серин (PS), фосфатидилглицерин (PG), сфингомиелин

**Подготовка образца**: Эти вещества экстрагируются (со всеми другими гидрофобными химическими соединениями) петролейнын эфиром. Может быть выгодной очистка образца на патроне Sep-Pak, заполненном сорбентом с обращенной фазой. Элюирование нейтральных липидов обеспечивается хлороформом, гликолипидов - ацетоном, фосфолипидов - метанолом.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны)

**Хроматограмма:** приведена в **публикации 98**

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: с силикагелем; 100 x 4,6 мм; размер частиц 5 микрон Подвижная фаза: ацетонитрил/метанол/вода (100:10:18) Скорость протока: 1 мл/мин Вводимый объем: 1,5 мкл Используемая для обнаружения длина волны: 200 нн

**Затруднения:** Очистка на патроне Sep-Pak может не дать требуемого количества липидной фракции. В таком случае, следует попробовать изменить порядок элюирования растворителями. При пользовании упрощенными подходами к подготовке образца, при подобном анализе может обнаруживаться множество затруднений.

**Советы и преимущества**: Для предварительного выделения различных фракций липидов, можно пользоваться твердофазным экстрагированием на патроне Sep-Pak.

**Литература для справок**: 98

## 4.5. Хлеб и кондитерские изделия

### 4 .5.1. Масляная, оротовая, 3-оксимасляная и молочная кислоты

Содержание этих органических кислот по-разному трактуется при оценке качества хлеба, тортов и пирожных высшего сорта, однако, анализ может быть проведен за одну хроматографическую разгонку (так, как описано в подразделе 3.1.5). Содержание масляной кислоты является показателем содержания масла в конкретном продукте. Никакие дешевые жиры природного происхождения не имеют такого специфичного триацилглицеридного (жирнокислотного) состава; поэтому, весьма просто установить, использовалось ли масло. Количество оротовой кислоты показывает, как много молока использовалось при производстве (этот показатель является дополнительным, поскольку подобную же информацию дает оценка количественного содержания лактозы). Содержание молочной кислоты, показывает активность микроорганизмов в яйцах, масле и молоке. На это содержание имеется допуск; если оно оказывается ниже допустимого,то только в этом случае продукт может продаваться как свежий. При более высоком содержании, продукт не может считаться свежим (и продаваться как свежий не может).

## 4.6. Макаронные изделия

### 4.6.1. Холестерин

Содержание холестерина показывает, как много яиц использовано при производстве продукта и соответствует ли он декларации о его высоком качестве (высоком содержании яиц). Иногда, необходимых высоких показателей добиваются обманным путем: добавкой желтых красителей. Внесение желтого красителя в пасту запрещено (если только об этом не имеется указаний на этикетке).

Метод, описанный в подразделе 4.1.14 (многокомпонентный анализ жиров и масел), может обеспечить проверку источника жира, дать количественные и качественные показатели, если используется детектор с диодной матрицей.

### 4.6.2. Красители

Как уже упоминалось выше, покупатель может быть введен в заблуждение добавкой красителей (симулирующих высокое содержание яиц или придающих продукту более естественный и привлекательный вид). Имеются разнообразные жирорастворимые и водорастворимые красители. После соответствующего экстрагирования, их содержание может быть определено так, как описано в подразделе 3.1.4.

### 4.6.3. Молочная и 3-оксимасляная кислоты

Эти вещества обнаруживаются в пищевых продуктах в результате жизнедеятельности микроорганизмов. Наличие таких кислот свидетельствует о нарушении условий хранения пищевых продуктов, содержащих яйца, молоко, масло и другие скоропортящиеся компоненты.

## 4.7. Овощи, фрукты и соки.

### 4 .7. 1. Пестициды

Содержание пестицидов контролируется в фруктовых соках и во фруктах ради охраны здоровья. Национальными или европейскими законодательными требованиями регламентируется содержание всех пестицидов. Особый интерес вызывает содержание во фруктах таких веществ, которые продляют их срок хранения (например, тиабендазол, о-фенилфекол, дифенил, дифениламин и борная кислота).

Анализ: после экстрагирования толуолом, эти вещества анализируются методом газовой хроматографии или жидкостной хроматографии так, как описано в подразделе 3.2.

### 4.7.2. АНИОНЫ ($NO_3$ , Cl, $PO_4$ )

Существует специальный реестр для фруктовых соков, в котором приводятся перечни составов со значениями для некоторых анионов (указывается типичное процентное содержание в конкретных соках). Все количества, выходящие за оговоренные диапазоны, указывают на возможные подделки, разбавления или специальные манипуляции.

Анализ: после сжигания сока до получения золы и разбавления золы подкисленной водой, проводится анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии так, как описано в подразделе 4.1.5.

### 4.7.3. Органические кислоты (соотношение лимонной и изолимонной кислот; яблочная кислота)

В реестре, упоминавшемся в предыдущем подразделе, указываются (помимо того) содержания некоторых органических кислот и некоторые соотношения различных кислот. Определяемые величины могут указывать на обман разбавлением или добавкой ароматических веществ. Иногда, ананасовый сок смешивают с более дешевыми соками и ароматизируют подбавлением характеристичных ароматизаторов в смесь. Типичным обманом является разбавление апельсинового сока с добавлением лимонной кислоты. Такое злоупотребление может быть выявлено благодаря контролю отношения лимонной и изолимонной кислот. Если отмечаемое отношение ниже указанного специального, это свидетельствует об обмане. Изолимонная кислота стоит настолько дорого, что маскировать надувательство добавлением такой кислоты (для получения нужного отношения) просто невыгодно. Часто, соки можно распознать с помощью ферментативных тестов (такой тест предлагает фирма "Boehringer"). Для каждой кислоты требуются разные ферменты. Для каждого сока нужен целый набор различных реактивов. Оценка может производиться автоматически; с помощью спектрофотометра и предлагаемой фирмой "Хьюлетт-Паккард" системой обработки данных UV ChemStation (Серия DOS ).

Весь анализ может выполняться по методу, описанному в подразделе 3.1.5, без необходимости в дорогостоящих ферментах, которые хранятся в течение лишь нескольких дней. Обработка образцов может быть очень легко автоматизирована с обеспечением высокой надежности (нужно лишь приобрести предлагаемое фирмой "Хьюлетт-Паккард" оборудование для высокоэффективной жидкостной хроматографии; затраты на такую закупку окажутся более малыми, чем расходы на приобретение наборов ферментов).

### 4.7.4. Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота (витамин С) - ценный питательный компонент фруктовых соков. Часто, на этикете встречается декларация о высоком его содержании. Необходим жесткий контроль, поскольку покупатели предпочитают приобретать сорта с действительно высоким содержанием и легко могут быть введены в заблуждение. Способ анализа содержания аскорбиновой кислоты описан в подразделе 4.10.2.

### 4.7.5. Пролин

Аминокислотный состав весьма характеристичен для конкретных фруктовых соков, что делает эти вещества очень важными для аналитической идентификации. Например, содержание пролина показывает, что апельсиновый сок действительно является натуральным. Для натуральных соков типично отношение формола к пролину менее 30.

### 4.7.6. Сахара

Анализ сахаров может выявить подделку (по соотношению конкретных веществ). Запрещено добавлять что-либо в натуральные природные соки. Однако, в наливки и фруктовые сиропы саха-

ра добавляться могут. Сиропы, продаваемые вместо природных фруктовых соков, могут быть опознаны так, как описано в подразделе 4.1.8.

## 4.7.6. Гесперидин

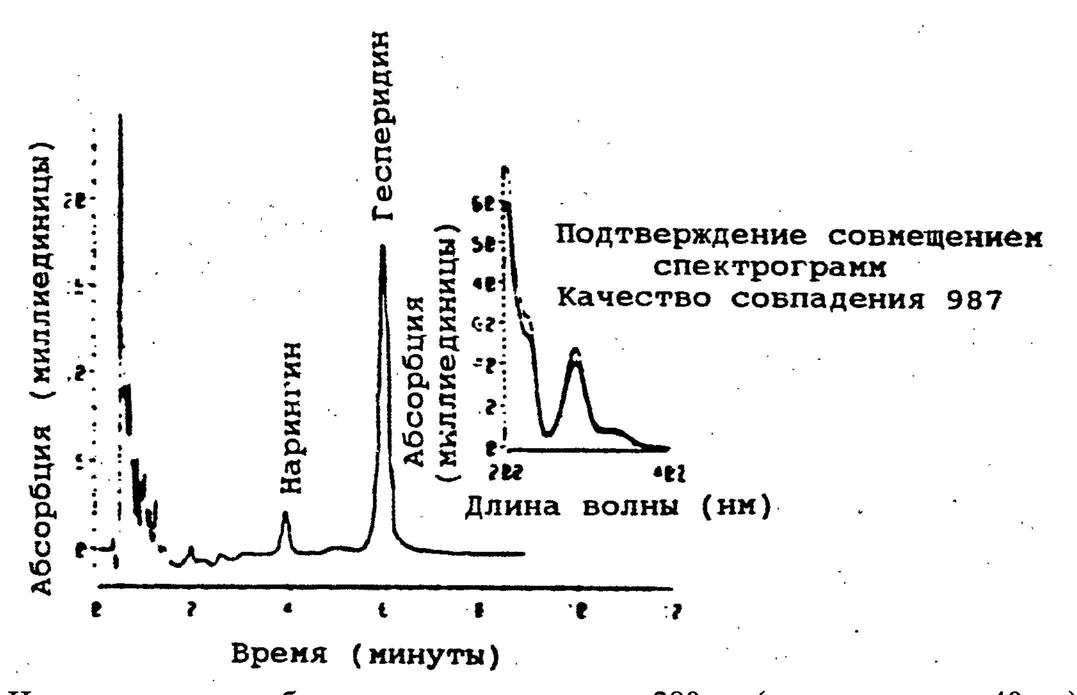
Обман смешиванием дорогого грейпфруктового сока с апельсиновым соком легко распознается по Присутствию гесперидина и нарингина. Другим фактором, влияющим на качество, является давление, используемое при выжимании сока. Из апельсинов сок выжимается без удаления корки. Поэтому, гесперидин, присутствующий в корке, переносится в сок, если используется слишком большое давление.

**Вещества**: Гесперидин, нарингин

**Подготовка образца**: Подготовка образца производится согласно методу, описанному Carrez (дающему возможность осаждения белков). После фильтрации сок непосредственно вводится в высокоэффективный жидкостной хроматограф.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащеннный изократическим насосом, устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны) или детектором с диодной матрицей.

**Соответствующие методу параметры**: Колонка: Hypersil ODS; 100 x 2,1 мм; размер частиц 5 микрон. (номер по каталогу HP799160D-552) Подвижная фаза: растворитель А: вода, pH2,5 (доводка серной кислотой ) растворитель В: ацетонитрил Изократическое элюирование: A:B=85:15 (отношение объемов) Скорость протока: 0,5 мл/мин Температура: комнатная Вводимый объем: 2.мкл




Используемая для обнаружения длина волны: 280 нм (ширима полосы 40 нм)

**Советы и преимущества:** Возможность регистрации спектрограмм непосредственно в ходе хроматографического разделения позволяет опознать гесперидин и нарингин за один анализ.

**Литература для справок**: 85

## 4.7.8. Коллоидные частицы в ананасовом соке

Из самодельного сока, концентрата и покупных соков были изолированы коллоидные частицы. Проведен сопоставительный анализ их состава. Помимо белков, эти частицы содержат (главным образом) полисахариды с преобладающими мономерами арабинозы, ксилизы, маннозы, галактозы, глюкозы, галактуроновой кислоты и глюкуроновой кислоты. Отмечено сильное различие распре-

деления конкретных сахаров. Однако, не отмечено типичных картин состава сахаров. Разделение выполнялось методом анионообменной хроматографии.

**Вещества:** Драбиноза, ксилоза, манноза, галактоза, глюкоза, галактуроновая кислота и глюкуроновая кислота

**Подготовка образца**: Изолирование центрифугированием (4200 cj, 20 минут). Супернатант профильтровывался и сразу же подвергался экстрагированию .из коллоидных частиц (за счет осаждения этанолом дважды). Предварительное препаративное разделение производилось на колонке с DEAE сефарозозой CL 6B. Элюирование обеспечивалось раствором NaCi (сначала- 0,05 ноль/л, затем - 0,5 ноль/л). Фракции, соответствующие пикам, собирались, обессоливались и лиофилизировались. Затем, проводился гидролиз раствором серной кислоты (1 моль/л). Анализ сахаров выполнялся методом газовой хроматографии, на капиллярной колонке, после превращения в ацетаты альдитов. Компоненты уроновой кислоты исследовались методом анионообменной хроматографии.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный изократическим насосом, устройством для введения образца, электрохимическим детектором.

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Carbopak PA-1 (Dionex; 4 x 250 мм); предварительная колонка с габаритами 4 x 50 мм
Подвижная фаза: ацетат Na (I)(1 моль/л) в растворе NaOH (0,1 моль/л)
Скорость протока: 1 мл/мин  Обнаружение: с помощью электрохимического детектора

**Затруднения:** Проходящие при гидролизе реакции между белковыми компонентами и сахарами могут повлиять на степень извлечения. Кроме того, степень извлечения может быть снижена за счет изомеризации компонентов сахаров.

**Советы и преимущества**: В Германии, стандартным считается метод разделения с помощью газовой хроматографии. Подготовка образца очень трудоемка и длительна; успех сильно зависит от опыта оператора. Лиофилизация должна производиться очень тщательно, поскольку вещества портятся очень быстро, если осталось какое-то количество воды. Для реализации стандартного метода, все реактивы должны быть обезвожены. Поэтому, рассмотренный метод оказывается менее сложным.

**Литература для справок: 144,** 145,146, 147, 148

### 4.8. Вина

Законодательные требования к винам действуют во всех странах Европы; оговариваются как состав, так и содержание этикеток. Соблюдения этих требований обязательны для каждой страны. Ниже приводится описание веществ и видов анализа, которые должны выполняться рутинно и могут быть реализованы с помощью оборудования, поставляемого фирмой "Хьюлетт-Паккард". Европейским декретом определяется состав продуктов, которые могут продаваться как вина (указывается допустимый процент содержания этакола, сульфита и т.д.). Все продукты, которые не соответствуют этим требованиям, запрещено называть вином.

#### 4.8.1. Консерванты

Запрещено использование консервантов в вине. Рутинно проверяют содержание сульфита, но кроме того важно проверять и отсутствие других консервантов, для чего может использоваться метод, описанный в подразделе 3.1.1.

#### 4.8.2. Сахар

Классификация вина зависит от содержания сахара: признание вина столовым или более высококачественным. Наряду с зависимостью от процентного содержания этанола, учитывается зависимость и от количества природного сахара. Классическим является метод, предложенный Luff-Schoorl. Такой подход оказывается крайне эмпирическим; требует работы очень опытных операторов; квалификация основана только на оценке восстановительного потенциала (исходя из предположения, что имеются лишь глюкоза или фруктоза). Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, описанный в подразделе 4.1.8, дает возможность опознать все сахара за одну хро-

матографическую разгонку. Любой обман за счет добавления сахарозы обнаруживается в ходе этого же анализа (не требуется никаких дополнительных исследований). В специальной литературе перечислен состав всех вин, доступных в каждой области: каждое из вин характеризуется собственным (уникальным) содержанием сахаров, органических кислот, глицерина и бутиленгликоля. Анализ содержания сахаров и органических кислот может показать, действительно ли вино поставлено из того района, который указан на этикетке.

### 4.8.3. Подслащивающие вещества

Использование подслащивающих веществ в винах не допускается. Но в некоторых районах, в которых меньше солнечного света, вина получаются с очень низким содержанием углеводов и глицерина, но с высоким процентом органических кислот. Быстрый метод определения подделки таких вин описан в подразделе 3.1.6

### 4.8.4. Красители

Вина, поступающие из районов с достаточно малыми периодами подверженности воздействию солнечного света, не содержат достаточных количеств антоцианов и гликозидов, ответственных за цвет вина. Вина, характеризующиеся яркой окраской, должны проверяться для определения, содержат ли они искусственные или природные красители. Искусственные красители могут быть распознаны благодаря быстрой разгонке в высокоэффективном жидкостном хроматографе (при пользовании спектрофотометрическим обнаружением) так, как описано в подразделе 3.1.4. Для получения красного вина используется природный краситель. Наиболее яркой окраской обладает вино Malvin, поставляемое из южной части Калифорнии. Окрашивающее действие этого вина столь сильно, что добавки даже нескольких капель достаточно для придания более яркого цвета другим винам. Такой природный краситель обладает специфичной способностью к флуоресценции, по которой его легко распознать.

### 4.8.5. АНИОНЫ (Cl, $NO_3$ , $SO_4$ )

Содержание хлорида рутинно контролируется методом титрометрического анализа с использованием $AqNO_3$ . Нитраты определяются колориметрическим методом, требующим употребления тяжелых металлов (Zn); содержание сульфата проверятся гравиметрически (с использованием бария). Такие тяжелые металлы представляют опасность для здоровья персонала; для обнаружения каждого аниона требуется индивидуальный (и трудоемкий) анализ. Содержание всех ионов можно проанализировать быстрым и легко автоматизируемым способом, если воспользоваться предлагаемым фирмой "Хьюлетт-Паккард" набором для анализа ионов, описанным в подразделе 4.1.5.

### 4.8.6. Этанол, спирты

Содержанием этанола, углеводов и органических кислот определяется качество вина. Классическим является способ определения удельной плотности вина перед перегонкой и после перегонки. Этот подход требует очень больших затрат времени на взвешивание. Подход, описанный в подразделе 3.9.9, дает тот же самый результат, но позволяет определить и другие параметры, требуемые для классификации вин. Официально признанным методом приходится пользоваться тогда, когда обнаруживается какое-то несоответствие существующим европейским требованиям. Быстрый анализ с помощью газовой хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии может использоваться для срочного получения поисковой информации. Трудоемкий официальный подход требуется только тогда, когда результаты выявляют выход за установленный допуск.

### 4.8.7. Органические кислоты

Анализ содержания органических кислот дает информацию об источнике вина, специальной обработке или подделках. Содержание винной кислоты - один из характеристичных параметров, определяющих качество и вкус вина. Количество этой кислоты может быть определено наряду с количеством и всех других органических кислот. Такой анализ может даже помочь установить район, в котором был собран урожай, использованный в качестве основы вина.

### 4.8.8. Спирт

**Вещества:** Уксусный альдегид, этилацетат, метанол, этанол, н-пропанол, 2-метил-1-бутанол, 3-метил-1-бутанол, уксусная кислота

**Подготовка образца:** Непосредственное введение в хроматограф

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и системой электронного регулирования давления.

**Хроматограмма:** приведена в публикации 112 (стр. 9)

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: HP-INNOWAX; 30 м х 0,25 мм х 0,25 микрон Температура колонки: 35°С в течение 5 мин; со скоростью 5°С/нин до 150°С; со скоростью 20 С/мин до 250°С; выдержка при 250°С в течение 2 минут Температура устройства для введения образца: 220°С Температура головки детектора: 275°С Поддувочный газ: азот; 25 мл/мин Топливные газы: водород (30 мл/мин) и воздух (250 мл/мин) Газ-носитель: гелий; 33 см/сек; 15,5 фунтов на кв. дюйм (35°С) Коэффициент деления потока: 1/25 Вводимый объем: 1 мкл

**Затруднения**: Кетоны могут мешать разделению

**Советы и преимущества**: Высокая полярность новых колонок HP-INNOWAX (химически привитый полиэтиленгликоль) обеспечивает легкое разделение альдегидов и спиртов при анализе непосредственно вводимых алкогольных напитков. Используемый фирмой “Хьюлетт-Паккард" универсальный процесс дезактивирования приводит к получению инертной поверхности колонки, позволяющей элюировать большие количества этанола (пик этанола оказывается довольно узким, с лишь незначительным затягиванием заднего фронта). Употребление выпускаемой фирмой "Хьюлетт-Паккард" системы Prep-Station автоматизирует процедуру определения содержания этанола в вине. Эта система (модель HP7986) обеспечивает подготовку образцов к хроматографическому разделению (повышает скорость и точность анализа). Рассмотренный метод соответствует официальному, утвержденному Ассоциацией специалистов по аналитической химии (АОАС).

**Литература для справок: 112, 3L58**

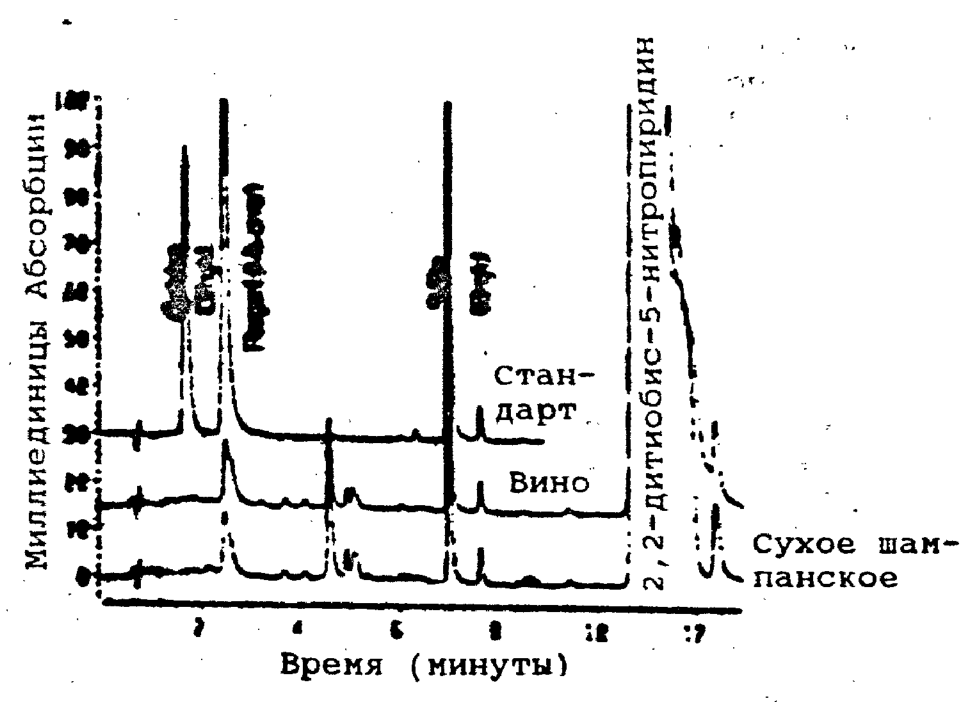
### 4.8.9. Сульфит

Сульфит добавляется в вино в качестве противоокислителя и консерванта. Его содержание не должно превышать 160 мг/л в красном вине и 225 мг/л в белом вине. Классическим является титрометрический метод, использующий восстановительный потенциал этого вещества. Наличие в вине других веществ, характеризующихся восстановительным потенциалом (например, сахаров), может давать возможность фальсификации результатов. Поэтому, выгодной оказывается идентификация сульфита при пользовании этапом специфичного автоматического получения производных до разделения на колонке непосредственно в хроматографической системе.

**Вещество:** Сул ьфит

**Подготовка образца**: Получение производных до разделения на колонке, с помощью 2,2-дитиобис-5-нитропиридина (DTN P)

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом (дающим возможность смешивания 2 растворителей), автоматический пробоотборник (обеспечивающий получение производных до разделения на колонке), спектрофотометрический детектор




**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: Hypersil ODS; 100 х 2,1 мм; размер частиц 5 микрон

Подвижная фаза: растворитель А: 0,1 М раствор ацетата натрия с 3 мМ кислым сульфатом тетрабутиламмония и 10% ацетонитрила, pH 3,5 (доводка $H_3PO_4$) растворитель В: ацетонитрил

Градиент: исходный состав: 5%В; от 5%В до 40%В за 4 мин; до 55%В за следующие 7 минут; до 95%В за 3 мин; промывка таким составом в течение 1 минуты

Скорость протока: 1,6 нл/мин

Температура: комнатная Вводимый объем; 1 мкл

Используемая для обнаружения длина волны: 320 нн

**Советы и преимущества**: Высокоэффективная жидкостная хроматография обеспечивает разделение производных сульфата, которые могут быть получены или в петле автоматического пробоотборника, или во флаконе. Рассмотренным автоматизированным методом, дающим сопоставимые результаты, можно воспользоваться в лабораториях, контролирующих пищевые продукты, в качестве поискового проверочного подхода.

**Литература для справок**: 138

### 4.8.10. 2,3-бутандиол

Запрещено наличие в вине гликоля и глицерина. Эти вещества улучшают букет, создавая впечатление о более высоком качестве. Глицерин - природное вещество, дающее тот же самый эффект; может быть опознан по соотношению глицерина с бутиленгликолем, но этот способ (основанный на спектральном анализе) очень трудоемок и требует больших затрат времени. Все эти вещества легко анализируются при употреблении одного (легко автоматизируемого) метода.

**Вещества**: 2,3-бутандиоя, гликоль

**Подготовка образца**: 5 мл вина + 2,5 нг внутреннего стандарта + 6 г карбоната калия + 3 мл хлороформа интенсивно встряхивают. Для разделения водной и органической фаз, смесь центрифугируют в течение 10 мин при 3000 q. Органическая фаза обезвоживается сульфатом натрия. Раствор используется для анализа методом газовой хроматографии.

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: 1) Кварцевая капиллярная; химически привитый *5%* фенилме-тилсилоксан; 25 и х 0,31 мм; толщина пленки фазы 0,52 микрона 2) кварцевая капиллярная; СР-Циклодекстрин-В-2,3,б-М-19; 50 м х 0,25 мм; толщина пленки фазы 0,25 микрона (фирма "Chrompack") Температура колонки: 50°С в течение 5 мин; со скоростью 4°С/мин до 220°С; выдержка При 220°С в течение 10 мин Температура устройства для введения образца: 200 С Температура головки детектора: 200°С Газ-носитель: гелий; 2 мл/мин Деле-

ние потока: A: 1/10- B: 1/100 Внутренний стандарт: моноэтиловый эфир диэтиленгликоля

**Хроматограмма:** приведена в публикации 139

**Советы и преимущества**: При старении вина и увеличении деки (от 3 месяцев до.5 лет), как в случае высококачественного хереса, доля (8,8)-энантиомера постепенно повышается (в пезоформе), а доля (Р,К)-2,3-бутандиола соответственно снижается. Возможен и анализ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии при регистрации детектором с диодной матрицей или рефрактометрическим детектором. Используются колонка HPH 87H (фирма "BioRad";300 x 7,8 мм)? температура 40°C; изократическое элюирование 0,008 н. раствором серной кислоты при скорости протока 0,6 мл/мин.

Литература; 139, 72

## 4.9. Кофе, чай

Кофе привозится из различных стран. Можно опознать страну происхождения кофе по аминокислотному составу. От изготовителя к изготовителю кофе цены сильно разнятся. Поэтому, требуется проверить соответствие исходной этикетке. Подобный анализ описан в подразделе 4.2.4.

Основным кислотным компонентой кофейных зерен является хлорогеновая кислота, разрушаемая до 70% (в зависимости от температуры) при прожарке зерен. Кроме хлорогеновой кислоты, в сырых зернах кофе могут быть обнаружены и некоторые другие органические кислоты (такие, как фёруловая кислота и ее эфиры, кумаровая кислота, китайская кислота).

Итаконовая, цитраконовая, мезаконовая кислоты - метаболиты лимонной кислоты. Способ определения таких веществ описан в подразделе 3.1.5.

Анализ хлорогеновой кислоты обсуждается в публикации 160. Спектрофотометрический метод основан на количественном определении на длине волны 324 нм после того, как хлорогеновая кислота окислена Pb(IV).

Анализ ароматических веществ может производиться с помощью газовой хроматографии (введение образца может осуществляться парофазным автоматическим пробоотборником; в этом случае, для определения количественного содержания таких веществ не требуется дополнительных подготовительных этапов).

### 4.9.1. Кофеин, теобромин

Алкалоиды кофеина (1,3,7-триметилксантина) и теобромина. (3,7-диметилксантина) ответственны за стимулирующее действие кофе, чая и какао. При оценке качества таких продуктов можно производить благодаря определению количественного содержания этих веществ.

**Вещества**: Кофеин (1,3,7-триметилксантин), теобронин (3,7-диметилксантин), тригоннеллин., теофиллин

**Подготовка образца:** Гомогенизированные зерна кофе (1,5 г) подогреваются в колбе на 300 мл (по меньшей мере, в течение 30 минут; при температуре, соответствующей кипению воды), в которую добавили 5 г Mg 0. После этого, объем в колбе доводят водой до 250 мл и оставляют на 46 минут. Эатем, после предварительной фильтрации, раствор пропускают через фильтр с размерами пор 0,5 микрона.

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца и спектрофотометрическим детектором

**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Hypersil BDS; RP-18; 100 x 4 нм; размер частиц 3 микрона

Подвижная фаза: растворитель A: вода, pH 2,1 (доведен уксусной кислотой), растворитель B:ацетонитрил

Градиент; 0-я мин 3%B 10-я **мин** 25%B

Скорость протока: 0,5 мл/мин Температура: 35°C Вводимый объем: 20 мкл

Используемая для обнаружения длина волны; 220 нм (ширина полосы 30 нм)

**Советы и преимущества:** Количественный анализ производится с использованием метода внешнего стандарта. Для небелковых азотсодержащих веществ, общепринятый метод основан на классическом определении азота по Кьельдалю. Подход с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии более перспективен, поскольку дает более быстрый анализ; имеется возможность дополнительной идентификации по спектрограммам.
**Литература для справок:** 7, 149

## 4.10. Диетические продукты

### 4.10.1Калорийность

Приходится следить за содержанием углеводов в диетических продуктах для больных, страдающих диабетом. Метод анализа сахара с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии описан в подразделе .4.1.8.

### 4.10.2. Витамины

Витамины классифицируются по растворимости в жире и воде, чем и определяется подход к их анализу. Несколько методов описано в литературе. Наиболее целесообразно пользоваться высокоэффективной жидкостной хроматографией и недавно разработанными методами капиллярного электрофореза, поскольку возможно одновременное определение многих компонентов. К специально витаминизированным пищевым продуктам и к витаминизированным напиткам предъявляются критерии, сформулированные в европейских указаниях, касающихся диетических продуктов,

Анализ жирорастворимых витаминов ($A_1$, $A_2$, $D_3$, $D_2$, E, $K_1$, $K_2$): теоретически возможно наличие 16 изомерных форм витамина А; наиболее важным из них является витамин $A_1$ (ретинол), существующий в природе в эфирной форме. Провитамин А (каротиноиды) превращается в витамин А в организме человека. Витамин А и каротиноиды содержатся в больших количествах в молоке, яйцах, мясе, рыбе, овощах и фруктах. Гидролиз щелочью разрушает эфирные связи, после чего производят экстракцию диэтиловым эфиром, очистку по методу гель-проникающей хроматографии (или какой-то способ элюирования из стеклянной колонки). После выпаривания досуха, образец растворяют в изопропаноле. Идентификация и количественная оценка производятся с помощью спектрофотометрического детектора или детектора с диодной матрицей. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии описан в подразделе 3.1.4.5.

#### 4.10.2.1. Витамины

Ниже рассматривается подход к анализу водорастворимых витаминов - (тиамин, пиридоксин, рибофлавин, никотинамид, пантотеновая кислота, фолевая кислота, биотин). Обычно употребляются какие-то фотометрические, флуориметрические, полярографические, титрометрические методы. Однако содержание каждого витамина приходится определять с помощью специфичного метода, специально под этот витамин приспособленного. Высокоэффективный капиллярный электрофорез дает возможность оценить содержание всех этих витаминов за один анализ. Используется кварцевый капилляр (с внутренним диаметром 50 микрон); 20 мМ раствор фосфата натрия (pH 7); введение давлением (.4,6 сек/40 мбар); положительная полярность; 20 кВ: *25°С.*

**Вещества:** Тиамин, никотинамид, пиридоксин, пантотенат, аскорбиновая кислота

**Подготовка образца**: Подготовка образца всегда производится для повышения селективности метода (для максимального устранения других компонентов матрицы образца) и концентрирования интересующих веществ (чтобы повысилась чувствительность к ним). Способы выделения из различных матриц различны. Разнообразные процедуры подготовки описаны в публикации 98.
**Прибор**: Система для капиллярного электрофореза. Электрофореграмма приведена в публикации 140

**Соответствующие методу параметры:** Капилляр - кварцевый: внутренний диаметр 50 микрон Буферный раствор: 20 мМ раствор фосфата натрия; pH 7,0 Напряжение: 20 кВ Пополнение буферным раствором после каждого третьего анализа Температура: 25°С Введение: 184 мбарсек Используемая для обнаружения длина волны: 215 нм (ширина полосы 16 нм)

**Затруднения:** Хорошей воспроизводимости можно добиться только после продолжительного уравновешивания капилляра и пополнения буферным раствором после каждого третьего анализа.

**Советы и преимущества:** Такой подход к разделению дает возможность быстрого определения содержания водорастворимых витаминов.

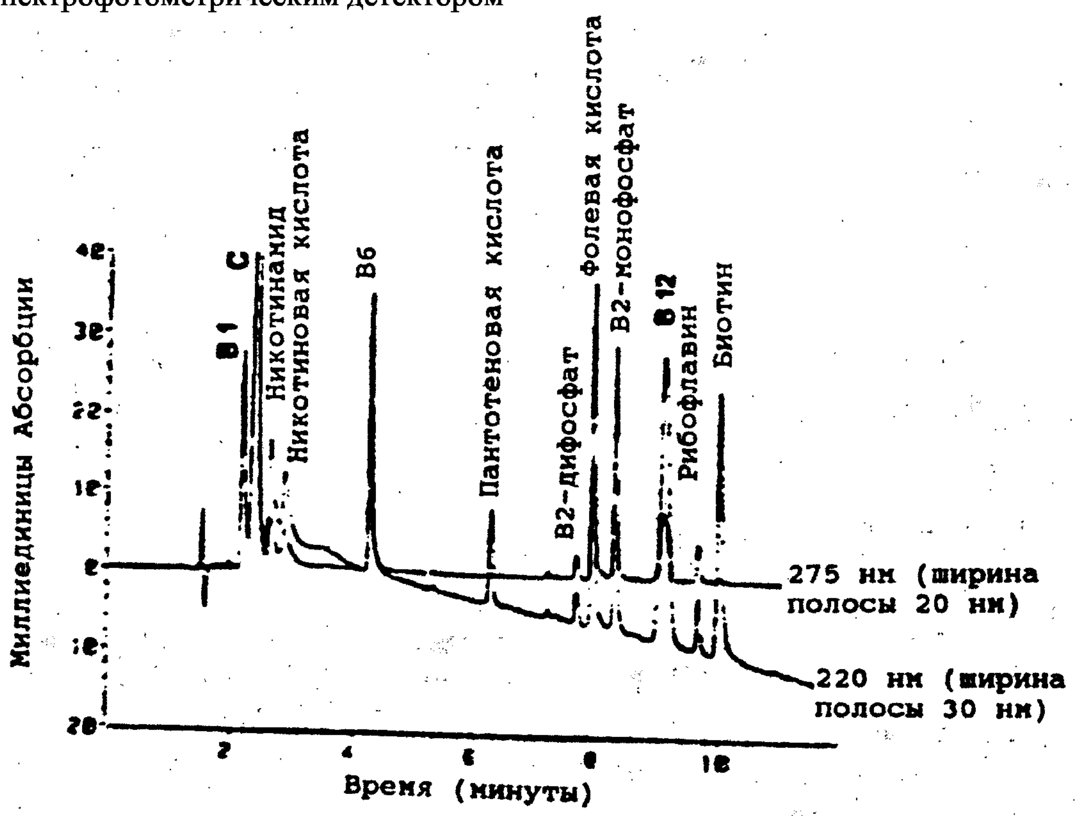
**Литература для справок:** 140

### 4.10.2.2. Водорастворимые витамины

**Вещества:** Никотинамид, тиамин, рибофлавин, пиридоксин, никотиновая кислота, цианокобо-ламин, фолевая кислота

**Подготовка образца:** описана в публикации 98

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим возможность смешивания 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором




**соответствумщие методу параметры**:

Колонка: Hypersil BDS; RP-IS; 100 х4 мм; размер частиц 3 микрона

Подвижная фаза: растворитель А: вода (рН 2,1? доводка серной кислотой) растворитель В: ацетонитрил/растворитель А (10%) Градиент: 0-я мин 0,3%В 10-я мин 25%В скорость протока: 0,5 мл/мин Температура: 35 С

Вводимый объем: 20 мкл

Используемые для обнаружения длины волн: А: 220 нм (ширина полосы 30 нм) В; 275 нм (ширина полосы 20нм)

**Затрунисния**: Возможны серьезные осложнения из-за влияния других компонентов матрицы образца

**Советы и преимущества**: Предложенный метод дает возможность анализа многих различных витаминов. Поскольку для каждого вещества существуют своя индивидуальная оптимальная длина волны, рекомендуется пользоваться детектором с диодной матрицей (для обнаружения каждого вещества с максимальной чувствительностью). Некоторые окисляемые витамины (такие, как витамин А, Bg, С, D и Е) могут анализироваться с помощью электрохимического детектора. Для всех этих витаминов можно добиться исключительно высокой чувствительности. Минимально обнаруживаемые количества составляли для витамина А (пальмитата) около 80 пкг, для g-каротина - около 50 пкг, для Bg и Е- около 30 пкг, для витамина С - ниже 1 пкг, для витамина D - около 70

пкг. Благодаря высокой селективности электрохимического детектора, подготовка образца может быть значительно упрощена.

#### 4.10.2.3. Аскорбиновая кислота

Аскорбиновой кислоте (витамину С) характерен высокий окислительно-восстановительный потенциал, ответственный за многочисленные физиологические окислительные и восстановительные процессы. Биохимическое воздействие аскорбиновой кислоты основано на участии в реакциях, соответствующих переносу электродов, и во многих процессах гидроксилирования.

**Вещества:** Аскорбиновая кислота, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота

**Подготовка образца:** Твердые образцы гомогенизируются вместе с 2% щавелевой кислотой. После фильтрации, образец может вводиться непосредственно.

**Прибор:** Система для капиллярного электрофореза **Электрофореграмма:** приведена в публикации 95

Соответствующие методу параметры - Капилляр: эффективная длина 56 сн; длина 64,5 сн Буферный раствор: 20 нМ боратный буфер; pH 9,0 Напряжение: 28 кВ Температура: ЗО^С Температура карусели; комнатная Введение: 150 мбарсек Используемая для обнаружения длина волны: 250 нм (ширина полосы 16 нм)

**Затруднения, советы и преимущества:** Раствор, используемый для экстрагирования, не должен содержать никаких окисляющих веществ. Из-за окисляемости и чувствительности к свету, анализ должен производиться незамедлительно.

**Литература для оправок**: 7,95

#### 4.10.2.4. Токоферол, витамин Е

Разделение токоферола было в течение многих лет довольно сложной задачей. Такой анализ требуется при производстве масел в целях контроля качества. Токоферол употребляется, в основном, в качестве противоокислителя. Сообщалось о специфичных защитных свойствах токоферола (дающих возможность защиты кожи человека от воздействия ультрафиолетового света, что приобретает особую важность из-за того, что толщина озонового слоя в атмосфере быстро уменьшается). Во многих косметических мазях и средствах для защиты от солнца применяются довольно большие количества витамина Е.

**Вещества:** токоферол, триацилглицериды, ситостерин, сигмастерин, холестерин, оксиперекиси.

**Подготовка образца:** Образец экстрагируется 5 мл метанола в ультразвуковой бане в течение 10 минут. Вводят 3 мкл супернатанта

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (обеспечивающим смешивание 2 растворителей), устройством для введения образца, многоволновым детектором, электрохимическим детектором или детектором с диодной матрицей

**Хроматограмма:** см. стр. 22

Соответствующие методу параметры: Колонка: MOS-Hypersil; 125 х 4 мм; размер частиц 5 микрон Подвижная фаза: метанол + перхлорат лития ($ г/д) уксусная кислота (1 г/я) Скорость протока: 1мл/мин Температура: 30°С Детектор: электрохимический Рабочий электрод: стеклоуглеродный Режим работы: амперметрический Потенциал: 0,9В Диапазон: 0,5 мкА Электрод сравнения: AgCI/KCI Постоянная времени: 8 сек :

**Советы и преимущества**: Пользуясь описанным методом, можно разделять и обнаруживать не только а-токоферол, но и примеси других изомеров токоферола (таких, как 0-токоферол, д-токоферол и у-токоферол), если они присутствуют. При указанных здесь условиях, д-токоферол и -у-токоферол не разделяются. В публикации 98 описан альтернативный метод, основанный на использовании спектрофотометрического детектора.

**Литература для справок:** 70,98.

### 4.10.3. Каротиноиды, хлорофилл

#### 4.10.3.1. Каротиноиды и хлорофилсодержащие пигменты

**Вещества**: Каротиноиды, хлорофилл, ксантофилл, лутеин, виолаксантин, кеоксантин, неохром, ауроксантин, эпоксид лутеина

**Подготовка образца**: Фрукты подготавливаются для анализа точно так же, как они подготавливаются для приема в пищу (т.е. несъедобные части удаляются). Экстрагирование производится после смешивания 50 г фруктовой пасты с 1-2 г карбоната натрия. Затем, добавляют ацетон для получения (примерно) 80% раствора при pH 8-9. Для отделения раствора от осадка необходимо центрифугирование. Эта операция повторяется до тех пор, пока остаток не остается обесцвеченным. Супернатанты собираются и подвергаются жидкожидкостному экстрагированию в делительной воронке с диэтиловым эфиром. Органическая фаза испаряется и состав ее остатка анализируется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Кроме того, возможно и извлечение каротиноидов методом сверхкритического экстрагирования. При таком подходе не требуется органических растворителей. Процесс сверхкритического экстрагирования быстр и полностью автоматизирован.

**Прибор**: Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный изократическим устройством для введения образца, многоволновым спектрофотометрическим детектором или детектором с диодной матрицей.

**Хроматограмма:** приведена в публикации 110

**Соответствующие методу параметры**:

Колонка: с обращенной фазой С-18 (предлагаемая фирмой "Хьюлетт-Паккард" колонка Hypersil ODS)

Подвижная фаза: метанол/ацетонитрил/тетрагидрофуран (35:58:7); изократическое разделение

Скорость протока: 1,0 мл/нин    Температура: ЗО С

Вводимый объем: 2 мкл

Используемые для обнаружения длины волн: А: 425 нм    В:400 нм    С: 504 нм

Продолжительность разгонку: 45 минут

**Затруднения:** При работе с образцами на свету, следует учитывать чувствительность веществ к свету. Существует и другой подход, описанный в публикации 110 (основанный на пользовании тонкослойной хроматографией). Такой анализ должен проводиться в полной темноте (из-за возможности разрушения интересующих веществ).

**Советы и преимущества:** Можно пользоваться 1-волновым спектрофотометрическим детектором (при установке высокой чувствительности). Однако, в этом случае, для подтверждения результатов придется ввести дополнительный этап химической идентификации. При работе с детектором с диодной матрицей, за одну разгонку возможны опознание и количественный анализ различных молекул с очень схожей структурой. Оптимальная длина волны (дающая наивысшую чувствительность) попадает в диапазон от 400 до 500 нм. При пользовании детектором с диодной матрицей, можно настраивать прибор на оптимальные длины волн для всех веществ.

Литература для справок: II, 12, 19, 20,21, 22,110,.

## 4.11. Ароматические вещества

Ароматические вещества добавляются к различным пищевым продуктам для улучшения представления об их качестве. Приходится по-разному относиться к специальным классам продуктов (в особенности тогда, когда одного типа продукты являются более дорогостоящими или когда различные традиционные, национальные предпочтения оказывают влияние на решения покупателя о приобретении).

### 4.11.1. Коньяк, бренди

Например, рассмотрим отличие коньяка от немецкого бренди. Эти напитки различаются количественным содержанием свободных летучих жирных кислот. Продукция, относящаяся к такой группе, очень схожа по составу; различия сортов не очень существенны. Как и в винах, основным компонентом является уксусная кислота; следующими (по относительному содержанию) оказываются муравьиные кислоты. В коньяке концентрации более летучих жирных кислот значительно выше, чем в немецком бренди. Преобладают свободные жирные кислоты счетным числом атомов углерода (от С4 до С10), образующиеся из закваски. Основные компоненты - киприловая и каприновая кислоты. Более низкое содержание более летучих свободных жирных кислот счетным чис-

лом атомов углерода в немецком бренди объясняется процессом дистилляции. Основа для напитков часто оказывается той же самой; во всех случаях, при первом процессе дистилляции попадают компоненты закваски.

Разделение жирных кислот уже обсуждалось ранее. Обычно пользуются методом газовой хроматографии. Более подробная информация может быть найдена в публикации 150.

### 4.11.2. Мед

Образцы меда, собранного пчелами с гречихи, одуванчиков, редьки, эрики, кустарниковых, хвойных деревьев, обследовались на ароматические вещества, образующиеся за счет вторичного метаболизма в растениях. Было опознано 80 ароматических соединений. К таким веществам относились карбоновые кислоты, альдегиды, спирты, углеводороды и фенолы. Содержание, во многих случаях, превышало порог обоняния. Поэтому, такие вещества приходится учитывать в описании общего аромата меда и специфичных (для разных растений) ароматов меда.

Выделение интересующих веществ обеспечивалось холодным жидкожидкостным экстрагированием органическими растворителями (ди-этиловым эфиром). Полученный экстракт фракционировал по степени кислотности (альдегиды, спирты, кетоны, фенолы, углеводы),
Ароматические вещества с гликозидными связями опознавались после кислотного гидролиза.

Анализ выполнялся с помощью газового хроматографа, а установление структур производилось с помощью масс-спектрометра. Результаты подобно обсуждаются в публикации 151.

### 4.11.3. Искусственные ароматизаторы

За один анализ, выполняемый методом газовой хроматографии, можно оценить содержание различных видов ароматических веществ. Количественное определение и идентификация обеспечиваются с помощью масс-спектрометрии. **Вещества:** Этилацетат, 1-лимонен, цис-3-гексенал, фенил-ацетат, фенилацетат, ацетат цис-3-гексенила, оксид розового, гексенол, нонанал, п-метилкрезол, деканал, камфора, бенилальдегид, линалоол, октанол, ментол, ацетат цитронеллила, альфа-терпинеол, бензилацетат.циторонеллол, гераниол, фенил-пропилацетат, нальтол, альдегид цикламена, альдегид коричной кислоты, изопропилмиристат, диметилантранилат, п-крезол, евгенол, гелиотропин, гелонал, индол, метилнафтилкетон, ксилол-мускус, ванилин, этиленбрассилат (мускус Т), лилиал, гидион

**Подготовка образца:** Никакой не требуется при введении образцов парофазным автоматическим пробоотборником

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный масс-селективным детектором.

Соответствующие методу параметры: Колонка: HP-INNOWAX; 30 м x 0,25 и x 0,25 микрон (каталожный номер 19091N-133). Температура колонки: от 80 С (без задержки) до 250 С со скоростью 3 С/мин; выдержка при250°С в течение 2 минут Температура устройства для введения образца: запрограммированное изменение от 70 С до 280°С за 5 минут (т.е. со скоростью 50°С/мин) Температура головки детектора: 280°С Газ-носитель: гелий; 30 см/сек, постоянная скорость протока 0,9 мл/мин (с помощью системы электронного регулирования давления) . Вводимый объем, 0,1 нкл Детектор: масс-селективный

**Советы и преимущества:** За счет пользования парофазным автоматическим пробоотборником, исключается подготовка образца (необходимая при любых других подходах). Масс-спектрометрическое обнаружение дает возможность опознать все вещества и определить их содержание за одну разгонку. Рассмотренный подход может быть использован для анализа различных видов пищевых продуктов, косметических средств и потребительских товаров (когда интересует содержание летучих ароматических веществ).
**Литература для справок: 129**

### 4 .11.4. Дигидроанетол, дигидросафрол, изосафрол

**Вещества:** Дигидроанетол, дигидросафрол, изосафрол, нетилса-лицилат, сафрол

**Подготовка образца:** Перегонка с водяным паром 200 мл обезгаженного образца. Добавление 1 мл н-децилового спирта (внутренний стандарт). Дистилляция со скоростью около 2 мл/мин в 100 ил трубке Несслера. Перенос перегнанного образца в делительную воронку на 250 ил; добавление 50 ил водного раствора NaCl. Экстрагирование 25, 25 и 10 мл хлороформа. Выпаривание до объема около 7 мл. Разбавление до 10 мл после охлаждения

**Прибор:** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором.

Соответствующие методу параметры: Колонка: набивная стеклянная, 1,8 м х 4 мм; 15% адипат про-пилеягликоля; 60-80 меш Температура колонки: 130^С Температура устройства для введения образца: 180°С Температура головки детектора: 220 С Газ-носитель: азот; 40 фунтов на кв. дюйм (скорость протока около 90 мл/мин) Вводимый объем: 5 мкл Внутренний стандарт: н-дециловый спирт

**Советы и преимущества**: Температура колонки может изменяться от 90 до 150 С со скоростью 2°С/мин. В публикации 160 описан другой подход, сводящийся к колориметрическому количественному анализу после получения производных с помощью водного раствора нафтол-2-сульфоната натрия.

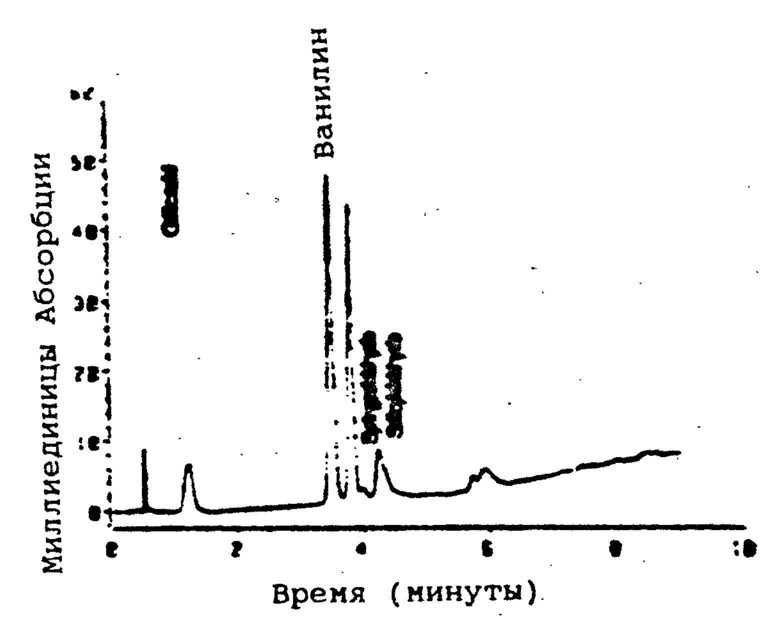
**Литература для справок:** 160

## 4.11.5. Ароматические вещества, входящие в состав ванили

Ваниль - наиболее широко используемая пряность. Различают 4 основных типа зерен ванили. Все они пользуются широким спросом покупателей (но в зависимости от качества аромата). Применение искусственного ароматизатора, подменяющего ваниль, - еще одна причина необходимости слежения за содержанием рассматриваемых веществ. На этикетке должен указываться вид ванили (природный ароматизатор или искусственный ).

**Вещества:** Протокатеховая кислота, оксибензойная кислота, альдегид п-оксибензойной кислоты, ванилиновая кислота, ванилин, бензальдегид, вератровая кислота, 3,4,5-триметилоксибенэойная кислота, коричный спирт, 3,4-диметоксикоричная кислота, коричная кислота

**Подготовка образца:** Мутные образцы должны быть профильтрованы. При работе с твердыми образцами требуется дополнительное экстрагирование этанолом (перед фильтрацией). Получаемый раствор может быть непосредственно введен в высокоэффективный жидкостный хроматограф




**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (дающим возможность смешивания 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны) или детектором с диодной матрицей

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: Hypersil ODS; 100 x 4,6 им; размер частиц 5 микрон (каталожный номер HP79916MO-554) Подвижная фаза - растворитель Д: 0,005 М водный раствор КНРО; pH 2,5 (доводка серной кислотой) растворитель В: метанол Градиент: 0-я мин 5%В 15-я мин 50%В . Вводимый объем: 5 мкл Используемая для обнаружения длина волны: 260 нм (ширина полосы 80 нм)

**Затруднения**: Может потребоваться дополнительная очистка экстракта ванили из мороженого (например, осаждение белков и обезжиривание)

**Советы и преимущества:** Ванилин - индикатор старения коньяка. Коньяк хранится в дубовых бочках. Ароматические вещества (такие, как лигнин) проникают в коньяк и частично разрущаются до ванилина. Чем больше хранится коньяк в бочке, тем больше ванилина обнаруживается. Возможна искусственная добавка ванилина
(для подделки выдержанного коньяка).

**Литература для справок:** 151

### 4.11.6. Мятное масло

**Вещества:** а-пинен, в-пинен, сабинен, лимонен , цинеол, нейтрон, ментофуран, d-изоиентон, ментилацетат, нентол, гермакрен

**Подготовка образца**: Использование парофазного автоматического пробоотборника исключает необходимость в какой-то предварительной подготовке образца

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

**Соответствующие методу параметры:** Колонка: HP-INNOWAX; 30 м x 0,32 мм x 0,5 микрона (номер по каталогу фирмы "Хьюлетт-Паккард": 19091N-213) Температура колонки: 6O°C Температура устройства для введения образца: 220°C Температура головки детектора: 275°C Газ-носитель: гелий; 40 см/сек; 11,7 фунтов на кв. дюйм Коэффициент деления потока: 60:1 Вводимый обьем: 0,5 мкл
Хроматограмма: приведена в публикации 129

**Советы в преимущества:** При пользовании парофазным автоматическим пробоотборником гарантируется, что в устройстве для ведения образца никаких остатков не остается (даже при отборе образца из флакона с патокой).

**Литература для справок**: 129

### 4 .11.7. Ароматизаторы, дающие запах клубивки

Анализ концентраций ароматических веществ в клубничном джеме, мороженом или лимонаде с клубничным запахом предоставляет информацию о пользовании искусственным ароматизатором.

**Вещества:** Этилацетат, этилбутират, изоамилацетат, амилацетат, изоамилбутират, амилбутират, ацетат цитронеллила,этилбенэоат, геранилацетат, цитронеллол гераниол, пентилэтаяол, *р-ионон,*этил-3-метил-фенилоксиранкарбоксилат, клубничный альдегид, бензилбензоат

**Прибор**: Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

**Соответствующие методу параметры:** Колонка; HP-INNOWAX; 30 н x 0,32 мн x 0,5 микрона (номер по
каталогу фирмы "Хьюлетт-Паккард": 19091N-213) Температура колонки: 60°C Температура устройства для введения образца: 220 °C Температура детектора 27 °C Газ-носитель: гелий; 40 см/сек; давление II,7. фунтов на кв. дюйм Коэффициент деления потока: 60:1 Вводимый объем: 0,5 нкл

**Хроматограмма:** приведена в публикации 129 Литература для справок: 129

### 4.11.8. Тиолы

Перечисленные ниже химические соединения представляют собой вещества с очень низким порогом обоняния. Они очень часто используются для придания различных запахов продуктам из фруктов и косметическим средствам. Возможно опознать место производства, если воспользоваться недавно описанным хироспецифичным анализом с помощью метода газовой хроматогра-

фии на модифицированных циклодекстринах. Разработка такого подхода привела к тому, что появились требования к опознанию подобных веществ на уровне микропримесей даже при рутинном анализе.

**Вещества**: 1-п-метен-8-тиол, 8-меркапто-п-нентан-3-он

**Подготовка образца**: Извлечение из соков, концентратов соков и фруктовых ароматизаторов обеспечивалось методом непрерывного жидкожидкостного экстрагирования при 40°С в течение 16 часов (после добавки смеси дихлорметана с пентаном). Экстракт обезвоживался сульфатом натрия. После фильтрации, экстракт разделялся на фракции на колонке Вигре. Раствор, сконцентрированный выпаривании, вводился в газовый хроматограф

**Прибор;** Газовый хроматограф, оснащенный пламенно-ионизационным детектором

Соответствующие методу параметры: Колонка: кварцевая капиллярная; 30 н х 0,25 нн х 0,25 микрона Температура термостата: 50 С в течение 3 мин; со скоростью 4°С/мин до 240°С; выдержка при 240°С в течение 10 минут Температура устройства для введения образца; 220°С Температура головки детектора: 250°С Газ-носитель: гелий; 1,6 мл/мин Коэффициент деления потока: 1/30 Вводимый объем: 1- 3 мкл

**Советы и преимущества:** Пользование гелем с избирательным сродством для обратимого связывания тиолов дает возможность избавиться от мешающих веществ. Элюирование тиолов обеспечивается за счет добавления другого тиола. При пользовании таким дополнительным этапом подготовки образца, можно обнаруживать оба изомера. Если этим этапом не пользоваться, разделения изомеров достигнуть не удается.

Литература для справок: 156

### 4.11.9. Горчащие вещества вз хмеля

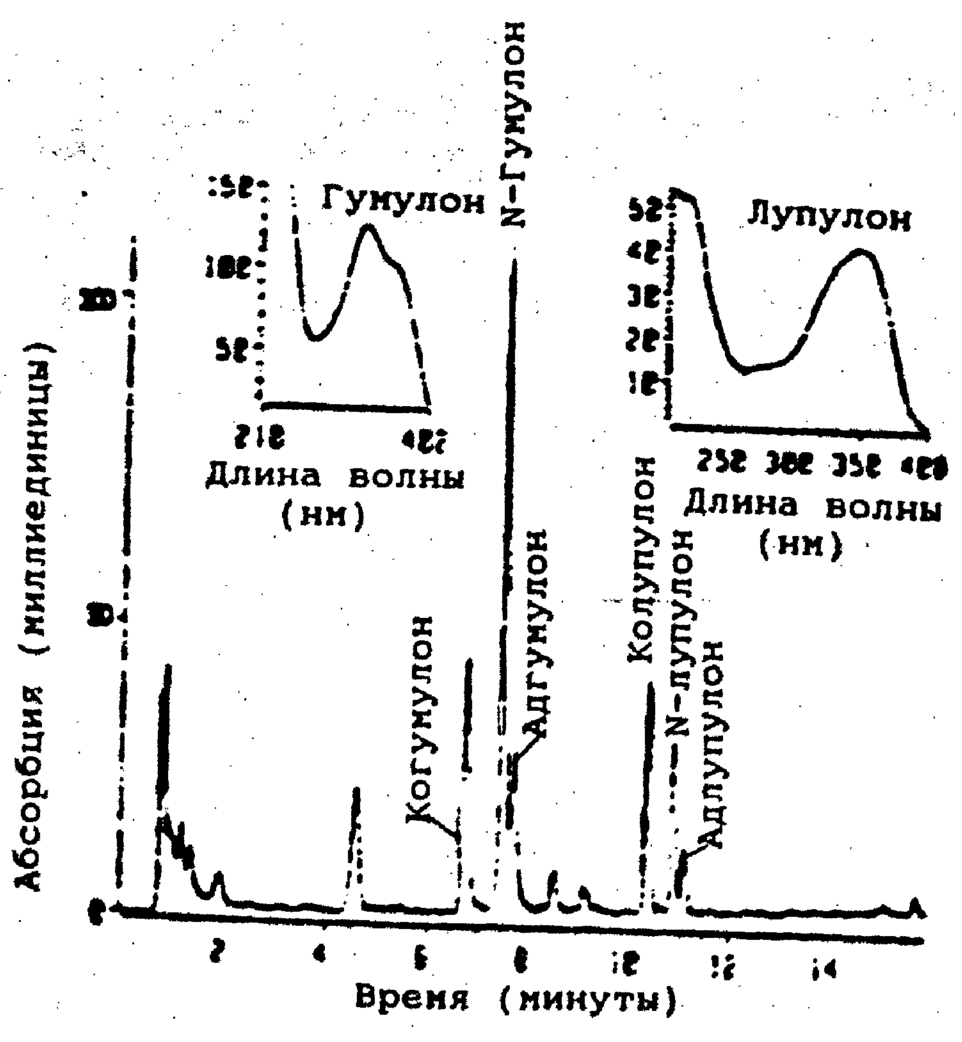
Вещества, извлекаемые из хмеля, используются при производстве пива. Эти горчащие вещества дает вклад во вкус. В целях контроля качества на пивоваренном производстве, приходится проверять весь сырьевой материал. Хмель исследуют на содержание горчащих веществ.

**Вещества**: N-гумулон, п-лупулон, когумулон, колупулон, адлупулон, адгумулон

**Подготовка образца**: Жидкожидкостное экстрагирование смесью метанола с диэтиловым эфиром (отношение объемов 20/100). Извлечение из измельченного образца производится в течение 30 минут. Затем добавляют соляную кислоту и продолжают экстрагирование еще в течение 10 минут; 5 мл эфирной фазы разбавляют 50 мл метанола. После фильтрации и центрифугирования, раствор может анализироваться с помощью высокоэффективной жидкостной хромато-графии

**Прибор:** Высокоэффективный жидкостный хроматограф, оснащенный градиентным насосом (дающим возможность смешивания 2 растворителей), устройством для введения образца, спектрофотометрическим детектором (с изменяемой длиной волны)

**Хроматограмма:**




**Соответствующие методу параметры:**

Колонка: Hypersil ODS; 100 x 2,1 мм

Подвижная фаза: растворитель А: 0,03 мМ $NH_4H_2(PO_4)$ растворитель В: метанол Градиент: 0-я мин бО%В 15-я мин 90 В

Используемая для обнаружения длина волны: 338 нм (ширина полосы 16 нм)

**Затруднения**: Образец должен предохраняться от окисления и от выдержки на свету

**Советы и преимущества**: При описанном способе экстрагирования, в образец может попадать множество веществ, способных поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра. Экстрагируемые воска могут приводить к затруднениям, обусловленным загрязнением колонки жидкостного хроматографа.

Существуют несколько стандартных методов анализа интересующих веществ, основанных на пользовании другим оборудованием:

- Поляриметрический анализ - Спектрофотометрический анализ - Кондуктометрический анализ

**Литература для справок: 98**

**Литература для справок**

(1) Arntliche Samrolung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L .00.00-2
(2) Amt-liche Sanonlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L. 00.00-9
(3) Gieger U. (1982) "Benzoesaeure in Sauermilcherzeugnissen und Frischkaese. HPLC Analyse von Benzoesaeure .und
pHB - Est-ern in Libensmittein" Lebensmittelchemie und gerichtliche Chemie 36:109
(4) Arntliche Sammiung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L.00.00-10
(5) Ait-zeroueller K./Arzberger E. "Analyse von Konservierungsstoffen in fetthaltigen Lebensmit-tein mittels HPLG", (1984) Z.Lebensm, Unters. Forsch. 178:279
(6) R.Schuster Application Note of Hewlett-Packard, "Rapid determination of Anti-oxidants and pre-servatives in foods**, Pub.Mr. :12-5954-6267
(7) Matissek/Schnepel/Stciner "Lebensmittelanalytic" Springer Verlag (1988) ISBN 3-540-13835-8
(8) Arotliche Sammiung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L.00.00-11
(9) Arntliche Samrolung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L chapter 57
(10) Gross J. "Quantitative Bestimmung des Farbstoffs Erythrosin in Kirschprodukten mittels HPLC'* Lebensmittelcheroie 46, 37-40 (1992)
(II) Pilar Cano "HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of 4 Kiwifruit cultivara". Journal of agricultural and food cheroistry 39, l786ff. (1991)
(12) R.J.Bushnay "Separation of Carotenoids in fruits and vegetables by HPLC", Journal of Chronato-graphy 8(8), 1527 -1547 (1985)
(13) Handbuch dcr LM CheTnie B'-^ TT (1967), S. 1363
(14) Heraann K. "Obst und obsterzeugnisse".Verlag PaulParey, Berlin (1968)
(15) Schornueller J., Langner H. "Analysengang zur quantitativen Bestimnung organischerSaeuren in Lebensmittein", Zeitchrift zur Lebensmittel Untersuchung und Forschung 113:104 (1960)
(16) Vaughn V.L., H.J.Sievert, Woodward C. "Computer aided development of a reversed phase HPLC separation of acids incofee". Application Note Hewlett-Packard 228-207 Pub. Nr.: (43) 5091-5324E (10/1992)
(17) Schuster R. "'Selective detection of the food additive aspartam". Application note Hewlett-Packard Pub. Nr.: 12- 5954-6267 •
(18) Grosspietsch H.Hachenberg H. (1980): Analyse von Acesulfam-K durch HPLC., Zeitschrift Le-bensmittel Untersuchung Forchung 171:41
(19) Schweizerisches LMBuch Bd. 1 (1964), S. 656
(20) Arntliche Sammiung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L57.09.12-1
(21) Arntliche Saiaialung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L57.09.08
(22) Arntliche Sannalung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L57.09.04-1 -
(23) R.Schuster, G. Marx, M. Rothaupt, "Analyses of Mycotoxines by HPLC with Confirmation by spectral library:", Application Note Hewlett-Packard Pub.Nr. :12-5091-8692E
(24)R.Eppeley, J.A.0.A.C., 1988, 73., 1176-1179
(25) Official methods of analysis for patulin. Mitt. Ges- Lebensmittelunters.-Hyg., 75, (1984), 506-513
( 26) Aintliche Sanmiung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L 00.00-15
(27) G.Becker, P.Schug, MiniaturisierungeinerMethodezur Ruecksytandbestimnung von Pestizidenin pflanziichen Lebensmittein", DFG-Methode S. 8, Lebensmittelchemie 44,7 •;-\. - 22- (1990)';
(28) Steinwandter H., Schlueter H.; 2. Anal. Chem.'286,90 '. ' (197.7)
(29) BeckerG. "Eine Multimethode zur Erfassungvon^S^ Pfanzenbehandlungsroittein auf pfanziichem Material"^ DeutsheLM-Rundschau, 75/5, (1979)
(30) Stijve T., "lonrganic bromide- a simple method or the confirmation of residue identity"; Deutsche Lebensmittel Rundschau, 81/10, (1985)
(31) Arbeitsgruppe "Pesticide": Mitt. Bl. GDCh-Fachgruppe, Lebensmittelchemie u. gerichtl.Chemie, 28, 219 (1974)
(32) R.Reupert, E.PIoeger, G.Brausen; "HPLC Determination of 29 controlled Herbicides in water supplies" Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.; 12-5952-2229

(33) R.Schuster, A.Gratzfeld-Huesgen, "Analysis of Phenoxy-acid herbicides by HPLC with Diode array detection", Hewlett- Packard Application Note Pub Nr.: 12-5091-0302
(34) R.Schuster, W.Haecker, A.Gratzfeld-Huesgen? "Gel. Permeation Chroroatography for sample clean-up-; Hewlett- Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5091-6241E
(35) EPA test roethod 610 "Polynuclear Aroratic Hydrocarbons" (July 1982)
(36) L.Huber, B.GIatz; "Analysis of Polyciclic aromatic Hydrocarbons with HPLC UV/Vis Diode 'array and fluorescence detection" Hewlett-Packard Application ^ote Pub. Kr.: 12- 5954-6281
(37) Amtiiche Samralung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L.00.00-13
(38) Preuss A. Thier H.-P.; Z. Lebensn. Unters. Forsch., 175, 93-100(1982)
(39) Preuss A. Thier H.-P.; Z. Lebensia. Unters. Forsch., 176, 5»ll (1983) -..
(40) Scherz H.; Z. Lebensia. Unters. Forsch., 181, 40-44 (1985)
(41) Amtiiche Sa-mnlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L.00.00-17
(42)Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Schadstoff Hoechstmengen V.Ov. 23.3.1988 (BAnz Nr.: 63, S. 1536)
(43)BGesundhBl., 35, S. 256-257 (1992)
(44) Ernaehrungsuroschau, 36, Sonderheft S. 482 (1989)
(45) "Der lebensmittelrechtl.iche Schutz des Verbrauchers vor Rueckstaenden ung Verunreinigungen" ZLR, 16, S. 427 (1989) (46) Schadstoff Hoechstmengen VO vom 23.3.1988 (BGBI. I, S. 422)
(47) E.KIein, M.Edelhaeuser, "Bestimnung von Malachitgruen- Rueekstaenden in Speisefischen, Deutsche. Lebensmittel Rdschau, 84, 77ff, (3/1988) (48) E.KIein, M.Edelhaeuser, "Bestiirnung von Malachitgruen- Rueckstaenden in Speisefischen, Ergaenzung, Deutsche Lebensmittel Rdschau, 84, 77 (1988)
(49) R.Schuster, "Analysis of Nicarbazine and Nitrofuranes in Eggs", Hewlett-Packard Application Note Pub.Nr.12-5954- 6268
(50)Multiroethod after Malisch, Z. Lebensm. Unters. Forsch., (1986), 182:385-399
(51) Ekstroero, Kuivinen, Del. of Metichlopindole, JAOAC, 67, (5), 955 (1984)
(52) EC-guideline 86/428 EWG (1985)
(53) Bekanntmachungen des BGA, "Bestinunung vonhormonell wirksamen Stoffen in Fleisch, Leber, Niere und Fettgewebe", Bundesgesundheitsbiatt 2/1989, 76-79
(54) R. Schuster, "Determination of Chlorarophenicol and Sulfonamidesin meat", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5954-6263
(55) M.Petz, "Tierarzneiroittelrueckstaende in Lebensmittein", Lebensmittelcheiaie, 47, 26-31, (1993)
(56) Hewlett-Packard brochure, "Basically a better column" Pub. Nr.: 12-5091-7351E '
(57) Journal of chroroatographic science, 196 (1981), p. 530
(58) M.Riedmann, B.GIatz "Sensitive HPLC Analysis of Aniuons using standard equiproent", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5091-4851E (59) Amtiiche Saimiungvon Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG L.00.00-13 (60) G.Rozing, "Rapid protein purification on a nonporoufi resin cation exchange column", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5953-2325
(61) M.Herold, R.Grimm, D.Heiger, "Application of protein characterization", Hewlett-Packard Application Note Pub. NT--: 12-5091-5566E
(62) M.Herold, "Sizeexclusion chromatography of proteins: Influence of salt concentration in the mobile phase", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5091-5735E
(63) DIN norm 10336 (August 1992)
(64) R.Schuster, "Multicomponent analyses of fats and oils using diode-array detection", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5954-6229
(65) M.Riedmann, B.GIatz, "Sensitive HPLC analysis of anions using standard equipment", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5091-4851E
(66) J.Fleming, T.Taylor.C.Miller, C.Woodward, "Analysis of complex mixtures of amino acids using the HP 1050modiular HPLC", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 228-212
(67) R.Schuster, "HPLC analysis ofamino acids in intraqvenous solutions", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12- 5954-8916
(68) J.R.Mazeo, J.S.Krull, Biotechniques, 10 (1991), 638
(69)MN.Zhu, R.Rodriques,T.Wehr, J. Chromatography,559, (1991), 479

(70) R.Schuster, "Multicomponent analysis of fats and oilos using diode-array detection", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5954-6269
(71) R.Schuster, "Determination of fatty acids in Margarine and butter by on column derivatization", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5954-0826
(72) R.Schuster, "Quality Control of alcoholic beverages by HPLC", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12-5954- 6270
(73) R.Schuster, "Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high performance liquid chromatography",J»Chromatography, 1988, 431, p. 271-284
(74) A.Gratzfeld-Huesgen, R.Schuster, H.Schulenberg-Schell, "Polynuclear aromatic hydrocarbons by .HPLC", Hewlett- ..: Packard Application Note Pub. Nr.: i2-5091"726QE . ."
(75) Krause l.,Neckermann H., EbertS.,Henle T.,Klosterroeyer H., (in preparation), Z» Lebensm.Unters. Porsch. (76)Y.Nagashiina, T.Noguchi,T.Kawabataand K.Hashimoto.,- NippoonSuisanGakkaishi,56 (1990), p. 765 .
(77) M.Quilliam, S, Ayer, S. Pleasance,G.Siin, T.Thibault, JC Marr., "Proceeding of "seafood 2000" Conference of Halifax 1990. National Research council of Canada, Halifax, Nova Scotia. 1990. Ch. 4
(78) J.Maruyaina, T.Noguchi, S.Matsunaga,K.Hashimoto, Biol. VChem., 48 (1984). p. 2873
(79) M.Nakamura, Y.Oshiroe,T.Yasurooto, TOXICON. 22 (1984), p. ..:: . 382 .. .. : . • . . • . • ' •
(80)B.Luckas, "Phycotoxins in seafood- toxicologicaland chromatographic aspects", J. of Chroroatography (1992), 2-18
(81) Arntliche Samrolung von Untersuchungaverfahren nach 835 LMBG L 23.04-1 (EG)
(82) Journal of Chromatographicecience, 19, ( 1981): 530
(83) V.L.Vaughn, H.J.Sievert, C.Woodward, "Conputer-aided developnent of a nornai phase HPLC separation of Tocopherols and Tocotrienols in vegetable oil", Hewlet-t- PacKard Application Note Pub. Nr..: 228-206
(34) RSK-^ert", fluessiges Obst. 3a (1982), p. 188 ff.
(85) R.Schuster, "Detennination of Hesperidine in orange juice", Hewlett-Packard Application' Note Pub. Nr.: 12- 5954-6264
(86) F.Siewek, R.Galensa, "HPLC Nachweis von Orangen- und Grapfruitsaftverfaelschungen", Obst und Geiaueseverw., 70 Jg. (1985), I
(87) "Separation of water- and fat soluble vitaiains by micellar electrokinetic chromatography". Journal of Chronatography, 547 (1991), p. 419-428
(88) "Micellar electrokinetic capillary chroroatography of vitar.in B6 with electrochemical detection", J. of Chrom. 585, (1991), h. 139-144
(89)H.Goetz, "Determination of Carbohydrates in a dietary softdrink", Hewlett-Packard Application Note Pub. Nr.: 12- 5954-0802
(90) L.Huber, "Good laboratory practice" Hewlett-Packard priner, 1993, Pub. No.; 12-5091-6259E
(91) G.A.Christ, S.J.Harston, H.W.Hembeck,"GLP-Handbuch fuer Praktiker",.GITVerlag, 1992. ISBN 3-928865-03-X (92) Official methods of analysis, "Urea", JAOAC 50, 56 (1967)
(93) Boehringer-Mannheim Brochure, (1984), "Methoden der enzyr.atishen Lebensmittelanalytik (94) Bio-Tec information, "Schnelle Analyse von organischen Saeuren", Bio-Tec No. I, Feb *94
(95) D.Beiger, M.Herold, R.Grimm, Hewlett-Packard primer, Volume I, "Applications of the HP3D Capillary electrophoresis System, (1994) '
(96) AOAC Official methods of Analysis (1990), 15th edition volume II, p. 1127
(97) AOAC Official methods of Analysis (1990), 15th edition volume II, p. 1128-1129
(98) Leo M.Nollet, "Food analysis by HPLC", Marcel **Dekker** inc., ISBN: 0-8247-8623-8, (1992), p. 426ff
(99) J.Hildand Ch.Gertz, Z.Lebensin. Onters. Forsch., 170: 103 (1980)
(100) R.Galensa andF.I.Schaefers, Z. Lebensro. Unters. Forsch., 173: 279 (19801
(101) G.A.Perfetti, C.R.Warner, and T.Fazio,J. Asooc. Off. Anal. Chem., 64: 844 (1981)
(102) L.V.Bui and C.Cooper, J.Assoc. Off.Anal. Chero., 70 (5): 892 (1987)

(103) P.M.Toppino, G.Contarini,L.Degano, and B.Battistotti, Sci. Tec. Latt. Casearia, 38: 397 (1987)
(104) W.FIak.W.Schaber, Mitt. Kliosterneuenburg, 38(1): 10 (1988)
(105) AOAC OFFicial methods of Analysis (1990), 15th edition volume II, p. 1157
(106) M.Koeniger, R.P.WalInoefer, "Untersuchung ueber das Verhalten von Thiabendazol bei Bananen", Deutsche Lebcnnmittel Rundschau, 89/12(1993), p. 384ff
(107) Isshiki, K.S.Tsuroura and T.Watanabe;J. Ass. Offic. Anal. Chem., 63, 747(1980)
(108) J .Gross, "Quantitative Bestiinroung des Farbsroffes Ery-throsin in Kirschprodukten mit-fcelsHPLC", Leber.snittelchenie, 46, 37-40 (1982) (109) J.P.Chaytor, R.L.Heal; J. Chronatogr. 886, 450 (1986)
(110) M.Pilar Cano, "HPLC separation of Chlorophyll and Carctenoid Pignents of four Kiwi fruit cultivars", J. Agric. and food CheJTi.',"'89/'No. 10., p.1786-1791, (1991)
(III) T.BrauJnann, L.H.Griiai^e, "Reversed phase high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids, Biochim. Biophys. Acta, 1981,637, 8-11
(112) Acitsbiatt der Europaeischen Gemeinschaften Nr. L 248/14 VOE 5.9.91
(118) "Official methods of analysis for patuilin. Mitt. Geb. Lebensiaittelunters.- Hyg., 1984,75, 506 - 513
(114) Reupert, E.PIoeger, G.Brausen, "HPLC Determination of 29 controlled herbicides in water supplies" Hewlett-Packard Application Note, Pub.No.: 12-5952-2229
(115) R.Schuster, A.Gratzfeld-Huesgen, "HPLC Analysis of Pesticide traces in the ppt-range", Hewlett-Packard Application Note, Pub.No.: 12-5952-1550
(116)1. E^ipfehiung: MittBl. GDCh Fachgr.Lebensinittelchem. u.. gerichtl. Chea., 25,129 (1971)
(117) G.E.Keppel, J. Assoc. Of fie. Anal. Chemists, 52, 1^2 (1969)
(118) G.E.Keppel, J. Assoc. Offic. Anal. Chemists, 54, 528 ' (IS71)
(119) T.E.Cullen, Anal. Chem., 36, 221 (1964)
(120) EPA Eethod 547, "Analysis of glyphosate in drinking water bydirect aqueous injection HPLC with post-column derivatization" Office of reseatch and developiaent, United states envirorunental protection agency, Cincinatti, Ohio, July 1990
(121) R.Schuster, A.Gratzfeld-Huesgen, "A comparison of pre- and post-colunm sample treatment for the analysis of Glyphosate" Hewlett-Fackatd Application Note Pub. No.: 12-5091-3621E
(122) R.Schuster, ."Analysis of Paraquat and Diquat by HPLC and Diode-array detection", Hewlett-Packard application note - Pub.No.:12-5091-1817E
(123) D.W.Coleman, C.B.Woodward, "Detenninationof N-Methylcar- bainates by post-colunm fluorometric detection'*,•Hewlett- Packard Application Note pub.No.; 12-5954-7852
(124) R.Schuster, "Analysis of mercaptobenzothiazoleby HPLC and diode-array detection", Hewlett-Packard Application Note pub.No.: 12-5091-4216E
(125) U.S. Environmental protection agency, 1989. EPA Method 640: "Determination of Mercaptobenzothiazole in vastewaters by liquid chromatography"
(126) A.Gratzfeld-Huesgen, R.Schuster, H.Schulenberg-Schell, "Polynuclear aromatic Hydrocarbons by HPLC", Hewlett- Packard Application Note, pub.No.: 12-5091-7260E
(127) United States Environmental Protection Agency, "Polynuclear aromatic Hydrocarbons-Method 610", July 1982
(128 D.R.Bobbit, K.W.Ng, "Chromatographic analysis of antibiotic materials in food". Journal of Chronatography, 624 (1992), 153-170
(129) HP-Innowax, HP-technical information pub.No.: 5962- 0031LE, (1994)
(130) Bauer H., Q^ast H., Shalaby A., Rocek P., "HPLC of Carbohydrates", LaborPraxis 9:660, (1985)
(131) Association of official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th edition, section 982.14, p. 71, (1988)
(132) Hewlett-Packard handbook for the Amino-Quant start-up kit part^ 79879A
.
(133) C.Looser, U.Wunderlich, U.F.Foelsch, "RP LC separation and simultaneous fluoriroteric detection of polyamines and their monoacetyl derivaties in human and aninal urine, serum acid tissue samples", J. of Chromatography, 430 (1988), p. 249-262

(134) Thielert G. "Entwicklungund Anwendung chronatographi- scher Methoden zur Untersuchung von Algen und Muschein auf PSP-Toxine.", Dissertation Universitaet Hohenheim, Deutsche Hochschulschriften 505, Verlag Haensel- Hohenhausen, Egelsbach, Koein, New York
(135) Shen J., "Die Bestimmung von DSP-Toxinen aus marinen Organisinen mit Hilfe der HPLC nach chemischer Derivatisierung, Dissertation Universitaet Hohenheim, Deutschland, (1991)'
(136) J.J.Sullivan, M.M.Wekell, in D.E.Kramer and J.Listen (Editors), "Seaffod quality determination, proceedings of an international Symposium coordinated by the university of Alaska, November 1986, Anchorage, A.L. 1986, p. 357.
(137) G.K.Poon, L.J.Griggs, C.Edwards, K.A.Beattie and G.A.Codd, Journal of Chrocatography, 628, (1993), p. 215- 233
(138) Hewlett-Packard Brochure, "Automated sample preparation and injection for PLC", product brief. Pub.No.: 12-5091- 2177E (1993)
(139) H.Hupf, W.Schmid, "Wein: ueber die Stereoisomeren des 2,3-Butandiols", Deutsche Lebensmittel Rundschau,90. Jg. Heft 1, (1994)
(140) U.Jegle, "Separation of water-soluble vitamins via high performance capillary electrophoresis". Journal of Chromatography, 652(1993), 495-501
(141) J.H.Sherman,N.D.Danielson, J.W. Hazey.J. Agric. Food Chem., 36, 966 (1988)
(142) J.Wangsa, M.A.Targove, N.D.Danielson, Talanta,37, 1151 (1990)..
(143) L.Bruehl,E.Schulte, H.-P. Thier, "Characterisierung massgeblicher Triacyiglycerine in Rohstoffen fuer saeuglingsnahrung und inllatt.erTOilch", Lebensmittelchemie, 47, p. 105ff. (1993)
(144) F.Will, S.Herbert, H.Dietrich, "Characterisierung von Kolloiden aus Ananassaef ten", Deutsche Lebensmittel Rundschau, 90 Jg., Heft 4 (1994)
(145) H.Dietrich, E.Zimroer, Weinwissenschaft, 44,13-19 (1989)
(146) Blakeney A.B., P.J.Harris, R.J.Henry, A.S.Bruce, Carbohydr. Res., 113, 23.9-9 (1983)
(147) F.Will, H.Dietrich, Z.Lebensm. Unters. Forsh, 191, 123-8 (1991)
(148) J.F.Saeman, J.L.Bubl, E.E.Harris, Industrial engineering chemistry, 17, 35-87 (1945) (
149) D.J.van Stegen, "Analysis of Caffeine andTrigonelline using high performance liquid chrowatography", J. Chroroat., 179; 199, (1979)
(150) W.R.Sponholz, H.H.Dittrich, N.Bausch, "Fluechtige Fett-saeuren in Weindestillat-en, Cognacs und deutschenb Weinbraenden", Deutsche Lebensmittel Rschau, 86. Jg., Keft 5., (1990) •
(151) E.Steeg, A.Montag, "Minorbestandteile des Honigs mit Arora-Relevanz", Deutsche lebensni-fctel Rundschau, 84. Jg. Heft 5 (1988)
(152) R. Schuster, "Deterinination of aronatic vanilla compounds in extract-s and beverages", Hewlett-Packard Application Note pub.No.: 12-5954-6265
(153) P.Gautschi, F.Mandel, "The detection of polinuclear aromatic hydrocarbons using the HP 5972A MSD", Hewlett- Packard Application Note MS 94-2, Pub.No.: (23)5962-8614E
(154) F.Mandel, "Trace analysis using the HP 5972A MSD, (Seminar in the box publication), Feb '94, Presentation . (MSD_ENVI.PRE)
(155) A.Gratzfeld-Huesgen, R.Schuster, W.Haecker, "Analysis of selected vitamins withHPLC and electrochemical detection, Hewlett-Packard Application Note Pub. No.: 12-5091-3194E
(156) G.Full, P.Schreier, "Kovalente chromatographie: Ein vertvolles Hilfsiaittel fuer die Aronastoffanalytik von Thiolen iia Spurenbereich", Lebensiaittelcheraie, 48, 1-4, (1994)
(157) R.Moegele, R.Galensa,: Bestiiaiaung.von Zuckern mittels Enzyirireaktoren (Biosensoren) in Verbindung Eit der HPLC", LebensiTiittelchemie,46, 40-52 (1992)
(158) "Alcohol (higher) and ethyl acetate in distilled liquors, AOAC official methods of analysis, 15th edition, volume II, p. 700 (1990)
(159) "Dihydroanethole, Dthydrosafrole in nonalcoholic beverages", AOAC official methods of analysis, 15th edition, vol. II, p. 754, (1990)
(160) JAOC, 52, 481 (1969)
(161) A.Apffel, "Analysis of Sulfonamide antibacterial drugs by electrospray LC/MS", Hewlett-Packard Application Note Pub.No.: (23) 5091-6468E (1993)

(162) J.Kirschbaula, B.Luckas, W.D.Beinert, "HPLC Analyse von biogenen Aroinen und Aminosaeuren in Nahrungsmittein nach autoinatischerVorsaeulenderivatisierung iait 9-Pluorenylmethyl Chlorofon-niat", Deutsche Lebensroittel Rundschau, 90. Jg., Heft 7 (1994)
(163) R.Schuster, "C2E Analysis of artificial sweeteners and preservatives in drinks", Hewlett-Packard Application Note., pub.No.:12-5963-1122E"..